

**Vergleichende Untersuchungen zur viruziden Wirkung von Desinfektionsmitteln
und Antiseptika gegenüber Poliomyelitis-Impfvirus und ECHO-Virus**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Wolfram Eschrich

geboren am 28. November 1981 in Neuhaus/Rwg.

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.12.2010

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Andreas Sauerbei, Jena
2. Prof. Dr. med. Wolfgang Pfister, Jena
3. Prof. Dr. med. Manfred H. Wolff, Witten

Für Leonie und Gabriel.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Bedeutung der Viruzidietestung von Desinfektionsmitteln und Antiseptika	3
2.2 Allgemeine Eigenschaften der Poliomyelitis- und ECHO- Viren	6
2.3 Infektionen mit Poliomyelitisviren	9
2.4 Infektionen mit ECHO-Viren	10
2.5 Desinfektionsmittel und Antiseptika mit Wirksamkeit gegen Viren	11
2.5.1 Aldehyde	12
2.5.2 Alkohole	14
2.5.3 Peressigsäure	15
2.5.4 Povidon-Jod	16
2.6 Aufgabenstellung	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Verwendete Lösungen und Rezepte	19
3.2 Getestete Desinfektionsmittel	20
3.2.1 Glutaraldehyd	20
3.2.2 Formaldehyd	21
3.2.3 Ethanol	21
3.2.4 Isopropanol	21
3.2.5 Peressigsäure	21
3.2.6 Povidon-Jod	22
3.3 Zellkulturen	23
3.4 Prüfviren	24
3.5 Quantitativer Suspensionsversuch	27
3.5.1 Versuchsdurchführung	27
3.5.2 Bestimmung der Infektiosität	28
3.5.3 Kontroll- und Vergleichsversuche	28
3.6 Statistische Analyse	30

Inhaltsverzeichnis	Seite
4. Ergebnisse	32
4.1 Bewertung der Kontrollexperimente	32
4.2 Glutar- und Formaldehyd	33
4.2.1 Glutaraldehyd 0,5%	33
4.2.2 Glutaraldehyd 2%	36
4.2.3 Formaldehyd 1%	38
4.3 Alkohole	43
4.3.1 Ethanol 70%	43
4.3.2 Ethanol 80%	45
4.3.3 Isopropanol 30%	49
4.3.4 Isopropanol 70%	51
4.4 Peressigsäure	55
4.4.1 Peressigsäure 0,05%	55
4.4.2 Peressigsäure 0,5%	57
4.5 Povidon-Iod	61
4.5.1 Povidon-Jod 0,05%	61
4.5.2 Povidon-Jod 0,125%	63
4.5.3 Povidon-Jod 0,5%	66
5. Diskussion	70
6. Schlussfolgerungen	82
7. Literaturverzeichnis	84
Eidesstattliche Erklärung	91
Lebenslauf	92
Danksagung	93

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BGM	Buffalo Green Monkey Kidney
BSL	Biosafety level
cpE	Zytophatischer Effekt
DM	Desinfektionsmittel
DVV	Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V.
ECHO	Enteric Cytopathic Human Orphan
ECS	European Committee for Standardisation
EMEM	Minimum Essential Medium Eagle
EV	ECHO-Virus
FA	Formaldehyd
FKS	Fetales Kälberserum
GA	Glutaraldehyd
HAV	Hepatitis A-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
mRF	Mittlerer Reduktionsfaktor
mVT	Mittlerer Virustiter
NTR	Nichttranslatierte Region
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PES	Peressigsäure
PMV	Poliomyelitis-Virus
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RF	Reduktionsfaktor
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TCID ₅₀	Tissue culture infective dose 50%
VP	Virusproteine
WHO	World Health Organisation

<u>Tabellenverzeichnis</u>	Seite
Tab. 1: Modellviren zur Prüfung von Desinfektionsmitteln	5
Tab. 2: Familie der Picornaviridae (Stanway et al. 2005)	7
Tab. 3: Zusammenfassende Darstellung der einbezogenen Desinfektionsmittel und Antiseptika mit den benötigten Konzentrationen und Einwirkzeiten	20
Tab 4: Übersicht über die Prüfung von Desinfektionsmitteln mit aufkonzentrierten Virussuspensionen	25
Tab. 5: Verwendete Formeln zur statistischen Analyse	31
Tab. 6: Zusammenfassende Darstellung der viruziden Wirksamkeit von Glutaraldehyd und Formaldehyd gegenüber Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk	42
Tab. 7: Zusammenfassende Darstellung der viruziden Wirksamkeit von Ethanol gegenüber Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk	48
Tab. 8: Zusammenfassende Darstellung der viruziden Wirksamkeit von Isopropanol gegenüber Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk	54
Tab. 9: Zusammenfassende Darstellung der viruziden Wirksamkeit von Peressigsäure gegenüber Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk	60
Tab. 10: Zusammenfassende Darstellung der viruziden Wirksamkeit von PVP-Jod gegenüber Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk	69
Tab. 11: Benötigte Einwirkdauer aller Prüfsubstanzen in min bis zum Erreichen einer Titerreduktion von $\geq 4 \log_{10}$ ohne Belastung, mit Belastung „clean conditions“ und Belastung „dirty conditions“	81

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	Seite
Abb. 1: Aufbau des Enteroviruskapsids (Fields et al. 2001)	7
Abb. 2: Strukturformel von Glutaraldehyd	2
Abb. 3: Strukturformel von Formaldehyd	3
Abb. 5: Strukturformel von Ethanol	14
Abb. 6: Strukturformel von Isopropanol	15
Abb. 7: Strukturformel von Peressigsäure	15
Abb. 8: Struktur von Poly(1-vinyl-2-Pyrrolidon)-Jod-Komplex (Schwarz und Schenk 1984)	17
Abb. 9: Chemische Reaktion von PES mit Zystein zu Essigsäure und Wasser unter Bildung eines Disulfids (R=Molekülrest)	22
Abb. 10: Formel zur Berechnung von PES-Konzentration nach iodometrischer Titration	22
Abb. 11: BGM – Zellmonolayer nach 2tägiger Inkubation mit 60facher Vergrößerung und Phasenkontrast	23
Abb. 12: Virusinduzierte zytopathische Effekte in BGM-Zellen 7 Tage nach Infektion mit dem Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm LSc-2ab, Vergrößerung 60 x, Phasenkontrast	26
Abb. 13: Virusinduzierte zytopathische Effekte in BGM-Zellen 7 Tage nach Infektion mit dem ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk, Vergrößerung 60 x, Phasenkontrast	26
Abb. 14: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0.5% Glutaraldehyd ohne Eiweißbelastung	35
Abb. 15: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0.5% Glutaraldehyd unter „clean conditions“	35
Abb. 16: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0.5% Glutaraldehyd unter „dirty conditions“	35

Abbildungsverzeichnis

Seite

Abb. 17:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 2% Glutaraldehyd ohne Eiweißbelastung	37
Abb. 18:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 2% Glutaraldehyd unter „clean conditions“	38
Abb. 19:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 2% Glutaraldehyd unter „dirty conditions“	38
Abb. 20:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 1% Formaldehyd ohne Eiweißbelastung	40
Abb. 21:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 1% Formaldehyd unter „clean conditions“	40
Abb. 22:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 1% Formaldehyd unter „dirty conditions“	41
Abb. 23:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 70% Ethanol ohne Eiweißbelastung	44
Abb. 24:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 70% Ethanol unter „clean conditions“	45
Abb. 25:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 70% Ethanol unter „dirty conditions“	45
Abb. 26:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 80% Ethanol ohne Eiweißbelastung	47
Abb. 27:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 80% Ethanol unter „clean conditions“	47

Abbildungsverzeichnis

Seite

Abb. 28:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 80% Ethanol unter „dirty conditons“	47
Abb. 29:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 30% Isopropanol ohne Eiweißbelastung	50
Abb. 30:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 30% Isopropanol unter „clean conditions“	50
Abb. 31:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 30% Isopropanol unter „dirty conditions“	50
Abb. 32:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 70% Isopropanol ohne Eiweißbelastung	52
Abb. 33:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 70% Isopropanol unter „clean conditions“	52
Abb. 34:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 70% Isopropanol unter „dirty conditions“	53
Abb. 35:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Peressigsäure ohne Eiweißbelastung	56
Abb. 36:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Peressigsäure unter „clean conditions“	57
Abb. 37:	Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Peressigsäure unter „dirty conditions“	57

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	Seite
Abb. 38: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,5% Peressigsäure ohne Eiweißbelastung	59
Abb. 39: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,5% Peressigsäure unter „clean conditions“	59
Abb. 40: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,5% Peressigsäure unter „dirty conditions“	59
Abb. 41: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Povidon-Jod ohne Eiweißbelastung	62
Abb. 42: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Povidon-Jod unter „clean conditions“	63
Abb. 43: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Povidon-Jod unter „dirty conditions“	63
Abb. 44: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,125% Povidon-Jod ohne Eiweißbelastung	65
Abb. 45: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,125% Povidon-Jod unter „clean conditions“	65
Abb. 46: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,125% Povidon-Jod unter „dirty conditions“	65
Abb. 47: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,5% Povidon-Jod ohne Eiweißbelastung	67
Abb. 48: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,5% Povidon-Jod unter „clean conditions“	67
Abb. 49: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Povidon-Jod unter „dirty conditions“	68

Kapitel 1: Zusammenfassung

Desinfektionsmittel (DM) und Antiseptika werden verwendet, um die Ausbreitung von Mikroorganismen und Infektionen zu verhindern. Die Inaktivierung humanpathogener Viren erfordert eine viruzide Aktivität, die aufgrund des Wirkmechanismus und des Aufbaus des zu inaktivierenden Virus nicht vorhergesagt werden kann. Daher ist es notwendig, DM in vitro gegen ausgewählte Viren zu testen. Das Poliomyelitisvirus (PMV) Typ 1 wird bis heute als eines der chemoresistentesten humanpathogenen Viren für die Testung von DM und Antiseptika auf virusinaktivierende Aktivität in der Humanmedizin eingesetzt. Im Zuge der Polioeradikation werden die Viren jedoch nur noch wenigen Laboratorien zur Verfügung stehen. Aus diesem Grunde ist es notwendig, einen adäquaten Ersatz zu finden. Ein entsprechender Virusvertreter sollte ähnlich wie das PMV unbehüllt sein, genetische Stabilität aufweisen und sich gut in Zellkulturen replizieren lassen. Eine Gruppe von Viren, die diese Anforderungen erfüllt, sind beispielsweise die ECHO-Viren (EV).

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Stabilität des EV Typ 1 Stamm Farouk mit der des PMV Typ 1 Impfstamm LSc-2ab gegenüber chemischen DM und Antiseptika im quantitativen Suspensionsversuch zu vergleichen. Zur Anwendung kamen Wirksubstanzen auf der Basis von Aldehyden, Alkoholen, Persäuren und Jod. Methodisch erfolgte der Einsatz des quantitativen Suspensionsversuchs ohne Eiweißbelastung sowie unter „clean“ und „dirty conditions“ entsprechend der deutschen Leitlinie und der europäischen Norm zur viruziden Testung von DM. Die Virusvermehrung wurde in Buffalo Green Monkey Kidney (BGM) – Zellen durchgeführt. Der Nachweis der Infektiosität der Virussuspensionen erfolgte über die Bestimmung der Tissue culture infective dose 50% (TCID₅₀). Um Unterschiede in der chemischen Stabilität der eingesetzten Viren festzustellen, wurde der Virustiter vor und nach der Einwirkung der DM bestimmt, und aus dessen Differenz wurden die Reduktionsfaktoren (RF) einschließlich 95% Konfidenzintervall ermittelt. Insgesamt wurden 3 unabhängige Einzelversuche durchgeführt und die mittleren Reduktionsfaktoren (mRF) von PMV und EV miteinander verglichen.

Gegen 1% Formaldehyd (FA) konnte das PMV ohne Belastung und unter „clean conditions“ innerhalb von 60 min, das EV innerhalb von 30 min inaktiviert werden. Unter „dirty conditions“ wurden beim PMV 120 min und beim EV 60 min zur Inaktivierung benötigt. Das EV zeigte eine signifikant höhere Resistenz in den Versuchen mit 0,5% und 2% Glutaraldehyd (GA). Hier wurde das PMV bereits nach 5 min inaktiviert. Die für das EV benötigte Einwirkdauer bis zum Erreichen einer Viruzidie war 60 min. Bei Verwendung von 30% und 70% Isopropanol konnten beide Viren innerhalb von 30 min nicht inaktiviert werden. Das PMV war signifikant stabiler als das EV gegenüber 70% und 80% Ethanol. Hierbei konnte das PMV nach 30 min nicht inaktiviert werden, während das EV durch 70% Ethanol ohne Belastung nach 10 min sowie unter Belastung „clean conditions“ nach 30 min inaktiviert wurde. Unter „dirty conditions“ konnte mit 70% Ethanol keine Inaktivierung des EV innerhalb von 30 min erzielt werden. Wurde 80%iges Ethanol verwendet, zeigte sich das EV sensitiv nach 10 min ohne Belastung und unter „clean conditions“ sowie nach 30 min unter „dirty conditions“. Wurde 0,05% Peressigsäure (PES) verwendet, konnte das EV ohne Belastung nach 5 min sowie mit Belastung nach 10 min inaktiviert werden. Im Vergleich dazu konnte die Infektiosität des PMV nach 30 min nicht signifikant beeinflusst werden. Signifikant stabiler war das PMV ebenfalls nach Einwirkung von 0,5% PES, wobei das PMV innerhalb von 5 min und das EV ohne Belastung sowie unter „clean conditions“ bereits nach 2 min inaktiviert wurde. 0,05% und 0,125% Povidon-Jod (PVP-Jod) hatten innerhalb von 60 min keinen signifikanten viruziden Effekt sowohl auf das PMV als auch auf das EV. Die Stabilität des EV erwies sich jedoch als geringer in den Versuchen mit 0,5% PVP-Jod. Ohne Belastung und unter der Belastung „clean conditions“ wurde es nach 10 min inaktiviert, während gegenüber PMV für den gleichen viruziden Effekt 60 min notwendig waren.

Betrachtet man alle vorliegenden Befunde, kann das PMV Typ 1 Impfstamm LSc-2ab im Vergleich zum EV Typ 1 Stamm Farouk als resistenter gegenüber FA, Ethanol, PES und PVP-Jod eingeschätzt werden. Lediglich gegenüber GA besitzt das EV eine größere Stabilität. Aufgrund dieser Differenzen ist das EV nicht als Ersatz für das PMV zur Testung der viruziden Aktivität von DM und Antiseptika in der Humanmedizin geeignet.

Kapitel 2 – Einleitung

2.1 Bedeutung der Viruzidietestung von Desinfektionsmitteln und Antiseptika

Hospitalinfektionen sind nicht nur beschränkt auf Bakterien oder Pilze als Verursacher. Die nosokomiale Infektion mit Viren hat eine stark unterschätzte Inzidenz. Daten aus den USA ergaben, dass bis zu 10% aller Hospitalinfektionen durch Viren verursacht werden (Wright und Bieluch 1993). In der Kinderheilkunde können es bis zu 40% sein (Wolff 1992). Kosten in Höhe von 17 bis 29 Milliarden Dollar werden pro Jahr durch nosokomiale Infektionen allein in den USA verursacht (Jarvis 2007). Ausgangspunkt nosokomialer Infektionen können nicht nur Patienten mit manifesten viralen Erkrankungen, sondern auch asymptomatische Virusträger sein. Beispielsweise sind gesunde Personen als Träger bzw. Ausscheider von Herpes-, Hepatitis- oder Enteroviren bekannt (Kolmos 2007). Diese Virusausscheider oder Virusträger, die wegen anderer Erkrankungen behandelt werden, sind als potentiell infektiös einzustufen. Übertragungen von nosokomialen Virusinfektionen erfolgen hauptsächlich über Schmierinfektion (Enteroviren, Adenoviren, Rotaviren), Tröpfcheninfektion (Herpes-simplex-Viren, Myxoviren, Adenoviren), Infektionen durch Blutprodukte (Hepatitis B-Virus, Hepatitis C-Virus, Zytomegalievirus und Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)) als auch durch infizierte medizinische Instrumente. Unter günstigen Bedingungen sind die Viren in der Lage, noch über Monate Infektionen zu verursachen (Jülich et al. 1993). Zu den Risikogruppen zählen hauptsächlich abwehrgeschwächte und alte Patienten.

Virusinfektionen haben nicht nur große Bedeutung im nosokomialen Bereich, sondern sind auch von öffentlichem Interesse. Die Influenza fordert in Deutschland jährlich bis zu 20.000 Todesopfer. Diese Zahl kann in Epidemie- oder Pandemiezeiten noch deutlich steigen (Lange und Schottler 2002, Wutzler et al. 2004). Ein weiterer Beleg dafür, dass virale Erreger aufgrund ihrer Anpassungsfähigkeit und der veränderten Mobilität des Menschen imstande sind, fortdauernd neue Infektionskrankheiten auszulösen, sind z.B. das Severe acute respiratory syndrome (SARS) (Rezza 2007), die Vogelgrippe (Neumann et al. 2009, Schwarz und Schenk 1984) und die neue Influenza (Osztoivits et al. 2009, Leggat et al. 2009, Dotis und Roilides 2009). Aufgrund globaler

Dimensionen dieser Infektionen kann das öffentliche Leben in den Industriestaaten erheblich beeinträchtigt werden.

Viruserkrankungen können bisher nur in begrenztem Maße mit antiviralen Medikamenten behandelt werden. Dazu gehören insbesondere Erkrankungen durch Herpesviren, Inflenzaviren, das HIV (Jülich et al. 1993) und zum Teil Infektionen durch Hepatitisviren (Bronowicki et al. 1997). Deshalb sind für die Vermeidung von nosokomialen Virusinfektionen präventive Maßnahmen besonders wichtig. Für die Unterbrechung der Infektionskette spielt die Verwendung von Barrieren, wie Handschuhe und Mundschutz, aber vor allem die Anwendung von DM mit Wirksamkeit gegen Viren eine wichtige Rolle (Prince et al. 1991). Die Auswahl der DM mit Viruswirksamkeit für die Humanmedizin erfolgt in Deutschland durch Prüfung im Suspensionsversuch auf Grundlage der Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) und des Robert Koch-Instituts (RKI). Die Richtlinie des RKI, schließt neben dem Suspensionsversuch auch Prüfungen zur Flächen- und Instrumentendesinfektion unter praxisnahen Bedingungen mit ein (RKI 2003). Das Prüfprinzip des Suspensionsversuches beruht auf der quantitativen Bestimmung der Abnahme der Infektiosität von Modellviren durch die Einwirkung eines DM unter festgelegten Testbedingungen in der Suspension. Als Modellviren eignen sich Viren mit großer Widerstandsfähigkeit gegenüber chemischen und physikalischen Noxen. Dabei sollte der unterschiedliche Aufbau von Vertretern differenter Virusfamilien sowie die klinische Relevanz Berücksichtigung finden (Thraenhart 1998). Derzeit sind in Deutschland auf der Grundlage der aktualisierten „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (DVV und RKI 2005) die in Tab. 1 zusammengefassten Modellviren zur Prüfung von DM mit Unterscheidung „begrenzt viruzid“ sowie „viruzid“ vorgeschrieben.

Tab. 1: Modellviren zur Prüfung von Desinfektionsmitteln

Virusstamm	Wirkungsbereich
Vacciniavirus, Stamm Elstree	begrenzt viruzid
Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Stamm NADL	begrenzt viruzid
Vacciniavirus, Stamm Elstree	Viruzid
Poliovirus-Impfstamm Typ I, Stamm LSc-2ab	Viruzid
Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75	Viruzid
Polyomavirus (SV 40), Stamm 777	Viruzid

Als DM, die Wirksamkeit gegen Viren besitzen, sind FA, PES, PVP-Jod, GA und Alkohole von Relevanz. Das PMV eignet sich besonders als Modellvirus, da es derzeit als resistentestes Virus gegenüber DM und Antiseptika gilt. Das Virus ist unbehüllt und wird zusammen mit Vertretern der Enteroviren (Coxsackie, EV) und dem Hepatitis-A-Virus (HAV), die ebenfalls als Modellviren im Gespräch sind, in die Virusfamilie der Picornaviridae eingeordnet. Ein wirksames Mittel gegen das PMV kann gewöhnlich auch gegenüber empfindlicheren Viren, wie z.B. dem HIV, als wirksam gelten (Thraenhart 1998). Mit dem Vorhaben der World Health Organisation (WHO), das Auftreten der Poliomyelitis weltweit auszurotten, wird das Virus in Zukunft nicht mehr in Laboratorien für die Viruzidietestung zur Verfügung stehen (Rey und Girard 2008). Im Jahr 1990, nachdem 1989 der letzte Wildvirustyp des PMV in der Schweiz isoliert worden war, empfahl die WHO in Laboratorien „Biosafety levels“ (BSL) für die Arbeit mit dem Wildvirus einzurichten (Minor 2001). Im Zuge der Vernichtung von Poliowildvirus-Stämmen in virologischen Laboratorien wurde im Jahre 2003 das PMV Typ 1 Stamm Mahoney durch den Impfstamm LSc-2ab in der deutschen Leitlinie zur Prüfung von DM 2003 ersetzt (DVV und RKI 2005). In der letzten Phase der Polioeradikation ist geplant, alle Polio-Impfstämme in den Labors zu vernichten oder sie in ein BSL-3 Labor zu überführen (Minor 2001). Damit wären PMV-Stämme als Modellviren für das Testen von DM nicht mehr verfügbar. Um einen adäquaten Ersatz

für das PMV zu finden, wurden bereits zahlreiche Stämme unter den Adenoviren auf Chemoresistenz überprüft (Sauerbrei et al. 2004b). Zu den weiteren Kandidaten gehören neben dem bereits erwähnten HAV das EV. Das EV besitzt den Vorteil, dass es aus der gleichen Familie wie das PMV stammt und in der Humanmedizin von klinischer Relevanz ist.

2.2 Allgemeine Eigenschaften der Poliomyelitis- und ECHO- Viren

Poliomyelitis- und ECHO-Viren gehören zur Gattung der Enteroviren, welche eine von 9 Genera aus der Familie der Picornaviridae darstellt. Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung aller 9 Genera mit den dazugehörigen Spezies (Stanway et al. 2005). Picornaviren haben eine Partikelgröße von 24-30 nm Durchmesser und besitzen RNA-Einzelstranggenome mit einer Größe von 7-8 Kilobasen. Die Viruspartikel sind nicht von einer Membranhülle eingefasst und das ikosaedrische Viruskapsid besteht aus den vier Virusproteinen (VP): VP1, VP2, VP3 und VP4. VP4 befindet sich an der Innenseite und ist mit dem Genom verbunden. VP1, VP2 und VP3 bilden die Außenflächen des Kapsids, an dessen Ecken eine grabenähnliche Vertiefung, der sog. Canyon erscheint. Dieser entsteht durch Wechselwirkung von VP1, VP2 und VP3 (siehe Abb. 1). Durch eine Pore im Canyonboden existiert eine Verbindung ins Partikelinnere. In dieser Region befindet sich ein Pocket-Faktor, welcher zur Stabilisierung der Kapside beitragen soll (Rossmann et al. 2002). Das Virion ist sehr stabil, weshalb eine enge Wechselwirkung der Kapsidproteine im Partikel angenommen wird (Modrow et al. 2003). Sowohl Polio- als auch ECHO-Viren produzieren einen zytopathischen Effekt in Zellkulturen, die von Affennierenepithelzellen abstammen (Hsiung und Melnick 1957) und sind gut für die quantitative Bestimmung der Virusinfektiosität im Suspensionsversuch geeignet.

Tab. 2: Familie der Picornaviridae (Stanway et al. 2005)

Genus	Spezies [Abkürzungen]
Aphthovirus	Maul-und-Klauen-Seuche-Virus Equines Rhinitis A Virus
Cardiovirus	Encephalomyocarditisvirus Thelovirus
Erbovirus	Equines Rhinitis B Virus
Enterovirus	Humanes Poliomyelitisvirus - PMV-1 (Mahoney), PMV-2 (Lansing), PMV-3 (P3/Leon/37) Humanes Enterovirus-A Humanes Enterovirus-B - 56 Serotypen inklusive ECHO-Viren Humanes Enterovirus-C Humanes Enterovirus-D Bovines Enterovirus Porcines Enterovirus-A Porcines Enterovirus-B Affenenterovirus
Hepatovirus	Hepatitis A Virus
Kobuvirus	Aichivirus Bovines Kobuvirus
Parechovirus	Humane Parechoviren Ljungavirus
Rhinovirus	Humanes Rhinovirus A Humanes Rhinovirus B
Teschovirus	Porvines Teschovirus

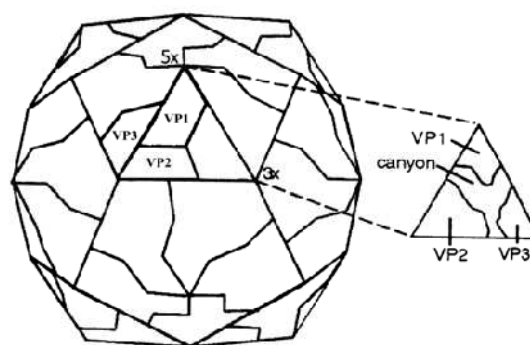


Abb. 1: Aufbau des Enteroviruskapsids (Fields et al. 2001)

Die virale Einzelstrang-Plus-RNA lässt sich aufgrund ihrer Funktion in drei Abschnitte einteilen: die 5'-nichttranslatierte Region (NTR), die Kodierungsregion (P1, P2, P3) und die 3'-nichttranslatierte Region (NTR) plus Poly-A-Schwanz. Die 5'-NTR ist 711 bis 750 Nukleotide lang. An deren 5'-Ende befindet sich ein kovalent gebundenes viruskodiertes Protein (VPg), das genomassoziierte virale Protein. Es enthält einen einzigen offenen Leserahmen, der ein Polyprotein kodiert (Kitamura et al. 1981). Dieses kann in die Bereiche P1, für die viralen Kapsidproteine, sowie P2 und P3 für Nichtstrukturproteine eingeteilt werden (Rueckert und Wimmer 1984). Die Virionen sind empfindlich gegenüber FA, GA, ultraviolette Strahlung und Chlor. Sie sind resistent gegen Chloroform, Äther, 4-wertige Amoniumverbindungen und 70%igem Ethanol, da die Virionen keine Hülle besitzen (Porterfeld 1989). Das Viruskapsid besitzt einen schützenden Proteinmantel. Werden bestimmte Proteine denaturiert, kann dies den Verlust der Infektiosität zur Folge haben. Entsprechend der Viruseinteilung nach Jülich et al. (1993) zur Beurteilung der Chemoresistenz in 4 Gruppen gehören die Picornaviren in die Gruppe 1. In dieser Gruppe sind die widerstandsfähigsten v.a. unbehüllten Virengattungen vertreten, welche eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen die meisten gebräuchlichen DM zeigen.

2.3 Infektionen mit Poliomyelitisviren

Von den PMV sind drei verschiedene Typen bekannt, wobei der Typ 1 am häufigsten vorkommt und schwere Erkrankungen verursachen kann. Die Viren werden fäkal-oral oder über Aerosole übertragen und verursachen die Poliomyelitis, was bereits 1909 von Landsteiner und Popper beschrieben wurde (Landsteiner und Popper 1909). In 90% der Fälle verläuft bei Kindern die Schmierinfektion inapparent. Der eigentliche Name wurde erst um 1955 geprägt (Von Magnus et al. 1955). Bei mehr als drei Vierteln der Erkrankten heilt die sog. abortive Poliomyelitis folgenlos aus. Bei der Erkrankung mit ZNS-Beteiligung werden drei Stadien unterschieden. Eine unspezifische Viruserkrankung mit katarrhalischen Erscheinungen der Luftwege und Diarrhoe sind kennzeichnend für das Initialstadium.

Das PMV infiziert bevorzugt die Peyer'schen Plaques im Darm und lokales Lymphgewebe im Hals- und Rachenbereich. Monozyten präsentieren auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für das Virus. Die Replikation findet aber nur in aktivierten Monozyten statt, und alle PMV interagieren mit dem menschlichen Rezeptor CD155 (Mendelsohn et al. 1989). Der Rezeptor gehört zur Immunglobulinsuperfamilie und besitzt drei Immunglobulin-ähnliche Domänen. Diese sind eine aminoterminal variable V-Domäne gefolgt von zwei konservativen Domänen vom Typ C2. Die Absorption des Virus erfolgt an der V-Domäne des Rezeptors, stabilisiert durch die C2-Domänen. Aktivierte Monozyten transportieren das Virus zu den Lymphknoten, von wo eine erste Virämie ausgelöst wird. Es folgt das präparalytische Stadium mit meningitischen Symptomen, welche binnen weniger Tage ausheilen können. Das Virus wird im gesamten Organismus verbreitet, wobei die Vermehrung vor allem in Endothelzellen und im retikuloendothelialen System stattfindet. Die dadurch ausgelöste zweite Virämie bewirkt den Befall von Rückenmark und Gehirn. Das paralytische Stadium ist gekennzeichnet durch Fieber, Kopfschmerz, Bewusstseinsstörung, Meningismus, schlaffe, asymmetrische Paresen, Muskelzuckungen und in 25% der Fälle Bulbärparalysen (Protas et al. 1978). In diesem Stadium kann noch zwischen einer spinalen Form, wobei erst die Extremitäten, später Rumpf und Atemmuskulatur betroffen sind, und einer bulbär-pontinen Form unterschieden werden. Bei dieser Form kann es zu einer zentralen Atemlähmung kommen. Pathogenetisch werden Ganglienzellen in der grauen Substanz und Motoneuronen im Vorderhorn geschädigt

und führen zu schlaffen Lähmungen. Hier konnte die Expression des CD155-Rezeptorproteins nachgewiesen werden (Gromeier et al. 2000), was möglicherweise den Befall dieser Region erklärt. Normalerweise bilden sich die Symptome innerhalb eines Jahres zurück, jedoch können Lähmungen, Durchblutungs- und Hauternährungsstörungen als Dauerschäden zurückbleiben (Deffeminis Rospide et al. 1967).

Als diagnostische Methoden können die Polymerasekettenreaktion (PCR), zum Nachweis viraler RNA oder der serologische Nachweis von Antikörpern im Neutralisationstest oder der Komplementbindungsreaktion angewendet werden. Die Virusisolation erfolgt aus Rachenspühlwasser oder Stuhl. Die Therapie erfolgt symptomatisch, z.B. mit Physiotherapie. Eine Prophylaxe erfolgt durch die Impfung.

Durch den konsequenten Einsatz von Schutzimpfungen konnte die Zahl der Polioerkrankungen in den achtziger Jahren des 20. Jahrhunderts signifikant gesenkt werden. Zuletzt wurden 1986 und 1990 durch Wildviren verursachte Poliofälle, und importierte Poliomyelitiserkrankungen 1992 in Europa registriert (Jilg 2000). Die WHO erklärte am 21. Juni 2002 Europa als poliomyelitisfrei. Weltweit wurden in nur noch 6 Staaten Infektionen durch zirkulierende Wildviren registriert. 90% aller Poliofälle betreffen Indien, Nigeria, Pakistan und Afghanistan. Im Jahr 2009 wurden 75% der 1.198 Poliofälle in diesen Endemiegebieten registriert (RKI 2009). Zur primären Prävention wurde die Polioviruslebendvakzine von Albert Sabin in Form einer Schluckimpfung verwendet. Auf Grund des Risikos einer Erkrankung an der vakzineassoziierten paralytischen Poliomyelitis („Impfpolio“) durch Revertanten wird dieser in den Industrieländern seit 1999 nicht mehr eingesetzt. Zur Grundimmunisierung wird derzeit ein von Jonas Salk entwickelter Impfstoff auf Grundlage abgetöteter Viren verwendet, bei dem das Risiko für das Auftreten einer sog. „Impfpolio“ gering ist (Hovi 2001).

2.4 Infektionen mit ECHO-Viren

Vom EV wurden bisher 30 Serotypen identifiziert. „ECHO“ war ursprünglich ein Synonym für „enteric cytopathic human orphan“. Diese Bezeichnung wurde gewählt, weil zum Zeitpunkt der Entdeckung des Virus ein Bezug zu einer Erkrankung noch zur Diskussion stand. ECHO-Viren kommen weltweit vor und werden v.a. fäkal-oral

übertragen. Tröpfcheninfektionen sind ebenfalls möglich. Die Übertragung erfolgt direkt von Mensch zu Mensch oder durch mit Stuhl oder Speichel kontaminierte Gegenstände. Zu den Symptomen einer Infektion mit EV zählen unspezifische grippale Infekte, Erkrankungen des Respirationstraktes, Diarrhoe sowie fieberhafte meningitische oder exanthemische Prozesse. Nach erster Vermehrung im lymphatischen Gewebe des Darmes oder Rachenraumes werden während einer zweiten Virämiephase entweder freie Viruspartikel oder infizierte Lymphozyten zur den Zielorganen wie Haut, Meningen, Myokard, zentrales Nervensystem, Leber und Respirationstrakt befördert. Von dort aus werden hauptsächlich erkältungsähnliche Erkrankungen (Rosen et al. 1964), aber auch Myelitis (Steigmann und Lipton 1960), Hautausschläge (Neva et al. 1954), Myokarditis (Kandolf und Hofschneider 1989), Gastroenteritis (Klein et al. 1960) und Meningitis verursacht. Das EV Typ 30 wird vor allem mit Meningitiden in Verbindung gebracht (Savolainen et al. 2001). Prinzipiell handelt es sich um uncharakteristische und beim Erwachsenen um leichte Erkrankungsverläufe. Zur Risikogruppe gehören insbesondere Neugeborene, da deren Immunsystem noch nicht vollständig etabliert ist. Zur Diagnose kommt vor allem die PCR oder der Antikörpernachweis im Neutralisationstest zum Einsatz. Die Therapie erfolgt symptomatisch. Derzeit bestehen keine Möglichkeiten der Impfprophylaxe.

Über Hospitalinfektionen mit EV wurde bisher auf Neu- und Frühgeborenenstationen berichtet (Cerny et al. 1983). Auch über Infektionen mit EV Typ 11 bei Neugeborenen wurde berichtet (Sauerbrei et al. 1983). Bei Erkrankungen von Neugeborenen kann die Letalität bis zu 42% betragen (Abzug 2001). Epidemien in Deutschland, verursacht durch EV wurden 1997 aus Frankfurt am Main (Buxbaum et al. 2001), 2000 aus Leipzig (Bottner et al. 2002) und aus dem Nordosten (Mentel et al. 2002) gemeldet.

2.5 Desinfektionsmittel und Antiseptika mit Wirksamkeit gegen Viren

Entsprechend einem Vorschlag des RKI erfolgt die Einteilung von DM bezüglich ihrer virusinaktivierenden Eigenschaften in die beiden Gruppen „begrenzt viruzid“ und „viruzid“ (Robert Koch-Institut 2003). Mittel mit begrenzt viruzider Wirksamkeit zeigen lediglich eine Aktivität gegenüber behüllten Viren. Mittel mit viruzider Wirksamkeit erfassen daneben auch die wesentlich resistendere Gruppe der unbehüllten Viren. Zu den wesentlichen Wirkstoffen, die für DM und Antiseptika mit Wirksamkeit

gegen Viren zum Einsatz kommen, gehören Alkohole, Aldehyde, Peroxide und Jodverbindungen, wobei die letzten drei genannten Gruppen auch eine Wirksamkeit gegen unbehüllte Viren aufzeigen.

2.5.1 Aldehyde

- Glutaraldehyd

Glutaraldehyd, ein 1,5-Pentandial, ist ein Dialdehyd des n-Pental und eine farblose, bei Raumtemperatur flüssige Verbindung mit starkem Geruch. In Abb. 2 wird die Strukturformel des GA dargestellt. In der Praxis wird GA beispielsweise als DM für Industrieanlagen oder bei medizinischen Produkten, als chemisches Konservierungsmittel, als Einbalsamierungsflüssigkeit oder in Lösungen zum Gerben von Leder eingesetzt.



Abb 2: Strukturformel von Glutaraldehyd

Im Vergleich mit FA verfügt GA über eine bessere Wirksamkeit gegenüber lipophilen Viren, da es mehr Kohlenstoffatome besitzt, und wie alle Aldehyde auch eine stark inaktivierende Wirkung gegenüber unbehüllten Viren. Im neutralen pH-Bereich hat GA die größte viruzide Aktivität. Glutaraldehyd mit einer Konzentration von 2% wirkt schnell inaktivierend gegen PMV Typ 1 (Boudouma et al. 1984). Eine Titerreduktion des PMV Typ 1 von mindestens 4 log₁₀ nach 1 min wurde bei der Verwendung von 2%igem GA beobachtet (Tyler et al. 1990). Prinzipiell zeigen Enteroviren gegenüber GA eine größere Resistenz als andere Virusgruppen (Klein und Deforest 1963). Gegenüber dem EV Typ 11 erwies sich GA als weniger wirksam (Drulak et al. 1978). Strukturelle Veränderungen des Sedimentationskoeffizienten der Viruspartikel konnten nach Einwirkung von GA nicht festgestellt werden (Baltimore und Huang 1968). Im Vergleich dazu wurde ein abweichender Sedimentationskoeffizient in Arbeiten mit dem Foot-and-Mouth-Disease-Virus gefunden (Sangar et al. 1973). Unter Anwesenheit von 20% Blutserum zeigte GA keinen Eiweißfehler (Borick et al. 1964).

- Formaldehyd

Formaldehyd ist der Trivialname für die giftige chemische Verbindung Methanal. In Abb. 3 ist die Strukturformel von FA dargestellt. Formaldehyd ist eine farblose, stechend riechende Substanz, welche sehr gut wasserlöslich ist. In der Natur kommt FA z.B. in Säugetierzellen als Stoffwechselzwischenprodukt oder in Früchten vor. Bei der Photooxidation in der Atmosphäre kann ebenfalls FA entstehen. Anwendung findet FA in der Industrie z.B. als Konservierungsstoff oder als Ausgangsstoff für viele chemische Verbindungen. Nachteile in der Anwendung sind die Kanzerogenität, der unangenehme Geruch und das Verursachen von Kontaktallergien an Haut und Schleimhäuten (Kiec-Swierczynska 1993). Als Ursache der hohen allergischen Potenz gilt die sehr ausgeprägte Affinität des FA zu Proteinen und somit die Wirkung als Hapten. Durch den Einsatz als DM konnte ein signifikant höheres Auftreten von FA-Allergien bei Beschäftigten im Gesundheitswesen im Vergleich zur Normalbevölkerung gefunden werden (Schnuch et al. 1998).

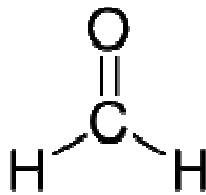


Abb. 3: Strukturformel von Formaldehyd

Vor allem in Flächendesinfektionsmitteln ist FA einer der wirkungsvollsten Bestandteile. Ein Einfluss auf die Virusaktivität beruht auf der Interaktion mit freien Aminogruppen von Purin- und Pyrimidinbasen und Säureamiden von Proteinen oder Nukleinsäuren (Jülich et al. 1993). Irreversible Veränderungen der Proteinstruktur können weiterhin durch entstehende Aminomethylol-Verbindungen mit Seitenketten anderer Aminosäuren verursacht werden (Heicken und Spicher 1962). Dies erklärt womöglich auch die langsam eintretende Wirkung von FA bzw. Aldehyden im Allgemeinen (von Rheinbaben und Wollf 1991). Viruspartikel des PMV wurden durch Behandlung mit FA morphologisch verändert (Wouters et al. 1973). Darüber hinaus konnten Veränderungen an den Nukleinsäuren des PMV durch Einwirkung von FA nachgewiesen werden (Sporkenbach-Hoffler et al. 1983), was eine vollständige Inaktivierung zur Folge hatte. Nach 15 min konnte das PMV durch Anwendung von

10%igem Gigasept (Schülke und Mayr GmbH, Hamburg-Norderstedt), in welchem 0,9% FA enthalten war, inaktiviert werden. Beim Coxsackie-Virus Typ B3 wurde erst nach 4 h eine Titerreduktion von mindestens 4 log₁₀ erreicht (Thraenhart und Kuwert 1975). Das PMV-Wildvirus Typ 1 konnte nach 120 min Einwirkdauer und einer Konzentration von 0,7% FA nicht inaktiviert werden (Munkel 1995). Bei der Anwendung von FA muss somit von relativ langen Einwirkzeiten im Suspensionsversuch ausgegangen werden, um einen viruziden Effekt zu erzielen.

2.5.2 Alkohole

- Ethanol

Ethanol ist eine farblose und brennbare Flüssigkeit mit charakteristischem Geruch. Es gehört zu den n-Alkanolen. Ethanol leitet sich von dem Alkan Ethan ab, in dem ein Wasserstoffatom durch die funktionelle Hydroxygruppe ersetzt wurde. Abb. 4 zeigt die Strukturformel von Ethanol.

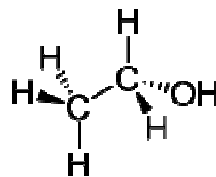


Abb. 4: Strukturformel von Ethanol

Anwendung findet Ethanol in Haushalts- und Konsumprodukten wie Lösungsmittel, Frostschutzmittel, Träger von Geruchsstoffen, in Lebensmitteln und alkoholischen Getränken sowie als Brennstoff und in der Medizin als DM und Antiseptikum.

Die Alkohole Ethanol (C₂H₅OH) und Isopropanol ((CH₃)₂-CHOH) dringen schnell in Mikroorganismen ein (Steuer und Lutz-Dettinger 1990). Die virusinaktivierende Wirkung steigt mit Konzentration und Temperatur. Alkohole sind Eiweiß-fällungsmittel. Die Eiweißdenaturierung ist die plausibelste Erklärung für die desinfizierende Wirkung von Alkohol (Larson und Morton 1991). In Kälte durchgeführte Fällungen sind reversibel und beeinträchtigen die Virusaktivität oftmals nicht. Ethanol inaktiviert in Konzentrationen von 70% bis 90% Coxsackie B1, Adenovirus Typ 2, Herpes-Simplex-Virus, Vaccinia, Influenzavirus, PMV Typ 1 und EV Typ 6 (Klein und Deforest 1963).

- Isopropanol

Isopropanol ist eine farblose, leicht flüchtige und brennbare Flüssigkeit mit süßlich-angenehmen Geruch. In Abb. 6 ist die Strukturformel von Isopropanol dargestellt. Isopropanol ist ein nicht-zyclischer, sekundärer Alkohol, welcher Anwendung z.B. in Lösungsmitteln, in Reinigungsmitteln, Entschäumungsmitteln sowie als DM findet. Die Eigenschaften und Wirkungsweise von Isopropanol als DM ähnelt der des Ethanol.

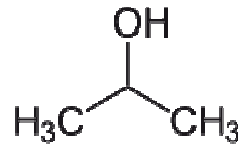


Abb. 6: Strukturformel von Isopropanol

Isopropanol ist gegen Enteroviren u.a. PMV 1 weniger aktiv als Ethanol und besser wirksam gegen Viren ohne Hülle (Klein und Deforest 1963). Es konnte gezeigt werden, dass Ethanol in Konzentrationen von 70% bis 80% sowie Isopropanol in Konzentrationen von 40% bis 60% sehr effektiv gegen das Feline Calicivirus ist (Yashpal et al. 1985), was als Surrogat des in der Humanmedizin bedeutsamen Norovirus gilt (Mattison et al. 2007, Cannon et al. 2006).

2.5.3 Peressigsäure

Peressigsäure gehört zu den Peroxykarbonsäuren und zerfällt in die umweltfreundlichen Endprodukte Essigsäure und Wasser. Die Strukturformel von PES ist in Abb. 7 dargestellt. Peressigsäure ist thermodynamisch instabil und eine 40%ige Lösung verliert zirka 1-2% ihrer Aktivität im Monat. Deshalb wird empfohlen, die Lösung mit deionisiertem Wasser und reinen Chemikalien zu versetzen und kühl zu lagern (Block 1991). Die PES ist eine farblose, stechend riechende Flüssigkeit und findet Verwendung z.B. als Bleichmittel aufgrund starker oxidativer Eigenschaften und als DM.

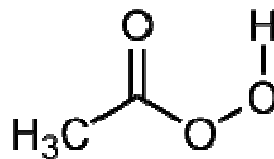


Abb. 7: Strukturformel von Peressigsäure

Peressigsäure wird als viruzides DM empfohlen, da es gegen behüllte und unbehüllte Viren eine gute viruzide Wirkung aufweist (Block 1991, Baldry 1983, Spröbig 1989). Andere Persäuren haben als DM eine geringe Bedeutung (Block 1991). Peressigsäure ist eine schwache Säure und somit im sauren Milieu wirksamer als im basischen. Über den Wirkungsmechanismus von PES wird vermutet, dass sie die Schwefelwasserstoff- und Amino-Gruppen in Proteinen und Enzymen sowie Doppelbindungen in Fettsäuren oxidiert (Block 1991). Starke Änderungen in der Virusstruktur durch Anwendung von PES waren ebenfalls nachweisbar (Wutzler und Sauerbrei 2000). Darüber hinaus zeigte sich eine Inaktivierung des Virusgenomes bei Adenoviren (Sauerbrei et al. 2004a). Beim PMV konnte demonstriert werden, dass das Viruskapsid durch PES zerstört und die Nukleinsäure fragmentiert wird (Sporkenbach-Hoffler et al. 1983). Innerhalb kurzer Zeit wirkt PES schon in niedrigen Konzentrationen bakterizid, fungizid und virusinaktivierend (Spröbig 1989, Merka und Sokol 1972). Wirkungsverluste bei Einwirkung von Licht, in Gegenwart von unedlen Metallen, Serum und Blut sowie bei Temperaturerhöhung wurden bei der Anwendung von PES beschrieben (Mücke 1973). PMV Typ 1 wurde nach 5 min bei einer Konzentration von 0,4% und das EV Typ 10 ebenfalls nach 5 min bei einer Konzentration von 1,25% PES inaktiviert (Kline und Hull 1960). In der gleichen Studie konnten auch Adenoviren vom Typ 3, 4, 5 und 7 sowie das Cocksackievirus B2 nach 5 min durch PES inaktiviert werden. Ohne Eiweißbelastung wurde das PMV-Wildvirus Typ 1 mit einer Konzentration von 0,1% PES nach 30 min inaktiviert werden. Mit 0,2% PES konnte dies schon nach 5 min erreicht werden (Munkel 1995). Durch Zugabe von Alkoholen lässt sich eine Wirkungssteigerung von PES erzielen (Spröbig 1989). Bisherige Versuche zeigten, dass mit der Kombination von 0,2% PES und 80% Ethanol PMV Typ 1 innerhalb von 1 min inaktiviert werden kann (Wutzler und Sauerbrei 2000).

2.5.4 Povidon-Jod

Povidon-Jod ist ein häufig eingesetztes Antiseptikum vor allem im Wundbereich. Hierbei handelt es sich um Trägersubstanzen, welche den freien aktiven Anteil von Jod speichern (Gottardi 1991). Es ist gut wasserlöslich aufgrund vieler freier Pyrrolidonringe. Abbildung 8 zeigt die Struktur des Poly-Jod-Komplexes.



Abb. 8: Struktur von Poly(1-vinyl-2-Pyrrolidon)-Jod-Komplex (Schwarz und Schenk 1984)

Bei Kontakt mit Wundsekret entsteht aus einem I_3^- -Ion molekulares Jod und Jodid (Görtz und Häring 1981). Molekulares Jod reagiert durch seine oxydativen Eigenschaften schnell mit SH- oder OH-Gruppen von Aminosäuren und Doppelbindungen von ungesättigten Fettsäuren (Gottardi 1991), was PVP-Jod eine gute antiseptive Wirksamkeit verleiht. Die Quartärstruktur von Enzymen wird so verändert, dass deren Funktion aufgehoben wird. Auch von Zellwandschädigungen durch PVP-Jod wird ausgegangen. Durch die nicht vorhandene Möglichkeit von Mikroorganismen, diese zu reparieren, fehlt eine Resistenzentwicklung (Reimer et al. 1997). PVP-Jod besitzt viruzide Wirksamkeit gegenüber behüllten, aber auch unbehüllten Viren (Kawana et al. 1997). Die Zerstörung des Genoms nach Einwirkung von PVP-Jod variiert stark. Nur bei einigen Adenovirustypen wie Typ 1, Typ 6 und Typ 19 konnte ein Einfluss von PVP-Jod auf das Genom beobachtet werden (Sauerbrei et al. 2004a). Eine Inaktivierung von Nukleinsäuren des PMV wurde bislang durch PVP-Jod nicht nachgewiesen (Bramer 1963, Hsu 1964). Die antimikrobielle Wirkung von Jod beruht auf dem schnellen Eindringen in Mikroorganismen (Chang 1971) und Angriffsstellen an Schlüsselgruppen von Proteinen. Dies sind freie schwefelhaltige Aminosäuren Cystein und Methionin (Gottardi 1991, Kruse 1970), Nukleotiden und Fettsäuren (Gottardi 1991, Apostolov 1980). Die antivirale Wirkung von PVP-Jod auf unbehüllte Viren beruht möglicherweise auf destabilisierenden Reaktionen von ungesättigten Kohlenstoffbindungen der Membranfettsäuren (Springthorpe und Sattar 1990).

2.6 Aufgabenstellung

Die geplante Eradikation der Poliomyelitis (WHO/V&B/3.11) führt dazu, dass das PMV nur noch begrenzte Zeit für die Testung auf Viruzidie von DM zur Verfügung stehen wird. Deshalb ist die gezielte Suche nach gleichwertigen Alternativen für das PMV erforderlich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das EV Typ 1 Stamm Farouk, im Vergleich zum PMV Impfstamm LSc-2ab hinsichtlich seiner Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen DM und Antiseptika untersucht werden. Hierbei war zu ermitteln, welche Vorteile das EV gegenüber dem PMV besitzt und ob eine Vergleichbarkeit der Stabilität beider Viren gegeben ist. Das EV könnte ein adäquater Ersatz für das PMV sein, weil es zur gleichen Virusfamilie gehört, gut replizierbar ist, klinische Relevanz besitzt, aber keine schweren Infektionen (evtl. Laborinfektionen) verursacht und ein stabiles Virus ist. Methodisch wurde der Einsatz des quantitativen Suspensionsversuch ohne Eiweißbelastung sowie unter „clean und dirty conditions“ gegenübergestellt, in Anlehnung an die „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (DVV und RKI 2005) sowie der europäischen Norm (ECS 2006). Die Ermittlung der Infektiosität erfolgte mittels Bestimmung der TCID₅₀ im Zellkulturtest. Um eine gute Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden die Einwirkzeiten von 2, 5, 10, 30 und 60 min der DM mit Ausnahme des FA aufeinander abgestimmt. Als Kontrollversuche dienten die Viruskontrollen ohne und mit Eiweißbelastung, sowie Zytotoxizitäts-, Nachwirkungs-, Interferenz- und Formaldehydkontrollen. Für die Bewertung der Wirksamkeit von DM sollte der Virustiter vor und nach der Einwirkung von DM bestimmt und aus dessen Differenz RF einschließlich 95% Konfidenzintervall bestimmt werden. Aus 3 unabhängigen Einzelversuchen wurde der mRF über das arithmetische Mittel bestimmt. Anschließend war geplant, die mRF von PMV und EV unter gleichen Testbedingungen miteinander zu vergleichen und statistisch zu analysieren.

Kapitel 3: Material und Methoden

3.1 Verwendete Lösungen und Rezepte

- Präparation von bovinem Serumalbumin für die Belastungsversuche unter „clean conditions“:

0,3 g bovines Serumalbumin (Cohn-Fraktion V für Dubos Medium, Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen) wurden in 90 ml sterilem A. bidest. gelöst. Nach Auffüllen auf 100 ml wurde die Lösung durch Membranfiltration sterilisiert.

- Präparation von bovinem Serumalbumin und Hammelerythrozyten für die Belastungsversuche unter „dirty conditions“:

Drei Gramm bovines Serumalbumin (Cohn-Fraktion V für Dubos Medium, Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen) wurden in 90 ml sterilem A. bidest. gelöst und auf 100 ml aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte die Sterilisation mittels Membranfiltration.

Sterile defibrinierte Hammelerythrozyten (Virion, RüschiKon, Schweiz) wurden nach ISO 6710 präpariert. Mindestens 8 ml Suspension wurden bei 800 x g für 10 min zentrifugiert. Danach erfolgte das Abgießen des Überstandes, Resuspension in Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,5) und mehrfache Zentrifugation, bis der Überstand farblos war. Im Anschluss erfolgte die Resuspension von 3 ml abzentrifugierten Erythrozyten in 97 ml 3%iger boviner Serumalbumin-Lösung.

- Zysteinhydrochlorid

Zysteinhydrochlorid wurde als 5%ige Stammlösung mit „Minimum Essential Medium Eagle“ (EMEM) angesetzt. Diese Lösung wurde mittels 1 N Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung auf einen pH von 7,4 eingestellt und steril filtriert. Zu Versuchsbeginn wurde die zu gebrauchende Verdünnung mit EMEM hergestellt. Die Konzentration von Zysteinhydrochlorid entsprach dem zweifachen der zu testenden PES-Konzentration. Diese Inaktivierungslösung wurde nach Ablauf der Einwirkzeiten 1:1 mit der Virus-Substanz-Suspension gemischt.

▪ Phosphate-buffered-saline (PBS) pH 7,3

NaCl	40,0 g
KCl	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
Na ₂ HPO ₄	5,7 g
A. bidest.	ad 5,0 l

3.2 Getestete Desinfektionsmittel

Eine Zusammenfassung der verwendeten DM und Antiseptika mit deren Konzentrationen und den dazugehörigen Einwirkzeiten wird in Tab. 3 dargestellt.

Tab. 3: Zusammenfassende Darstellung der einbezogenen Desinfektionsmittel und Antiseptika mit den benötigten Konzentrationen und Einwirkzeiten

Desinfektionsmittel	Konzentrationen in %	Einwirkzeiten in min
Peressigsäure	0,05; 0,5	2, 5, 10, 30
Glutaraldehyd	0,5; 2	5, 10, 30, 60
Formaldehyd	0,7*; 1	30, 60, 120, 240
Ethanol	70; 80	2, 5, 10, 30
Isopropanol	30; 70	2, 5, 10, 30
Povidon-Jod	0,05; 0,125; 0,5	2, 5, 10, 60

* Kontrollversuch

3.2.1 Glutaraldehyd

Die Präparation der verwendeten Lösung von GA erfolgte aus kommerziell vertriebener 50%iger Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Eine 5%ige Lösung wurde durch Abwiegen hergestellt: Entnahme von 1 g Glutaraldehyd unter dem Abzug, Auffüllen

auf 100 ml mit PBS (pH 7,4±0,2). Diese diente als Stammlösung, aus welcher die für den Versuch benötigten Konzentrationen (siehe Tab. 3) durch Verdünnen mit PBS hergestellt wurden.

3.2.2 Formaldehyd

Die Versuche mit FA wurden entsprechend der „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (DVV und RKI 2005) als Vergleichsversuche ohne Serumbelastung sowie als Regelversuche inklusive Belastungslösungen durchgeführt.

Vor dem Start des Versuches wurde die benötigte Konzentration (siehe Tab. 3) durch Verdünnen mit A. bidest. aus einer 37%igen Stammlösung (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) erzeugt.

3.2.3 Ethanol

Bezogen wurde die 99,8%ige Ethanol-Stammlösung von der Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen). Vor Versuchsbeginn wurden die benötigten Konzentrationen (siehe Tab. 3) durch Verdünnen mit sterilem A. bidest. hergestellt.

3.2.4 Isopropanol

Isopropanol wurde als ≥99,5%ige Stammlösung von Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) zur Verfügung gestellt. Die benötigten Konzentrationen (siehe Tab. 3) wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn durch Verdünnen mit A. bidest. bereitgestellt.

3.2.5 Peressigsäure

Peressigsäure wurde in Form von Wofasteril® (Kesla Pharma Wolfen GmbH, Greppin) verwendet. Wofasteril® enthält 40% PES. Seine Lagerung erfolgte bei 4°C. Es wurde eine 2%ige Lösung durch Verdünnen mit A. bidest. hergestellt. Die Ermittlung der aktuellen Konzentration erfolgte durch iodometrische Titration (Mücke 1973) vor Versuchsbeginn. Von dieser Stammlösung wurden durch Verdünnen mit A. bidest. die zu testenden Konzentrationen (siehe Tab. 3) angefertigt.

Um die Wirkung von PES nach den entsprechenden Einwirkzeiten zu unterbinden, wurde Zysteinhydrochlorid (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) verwendet. Dieses

hatte sich in vorausgehenden Studien (Wutzler und Sauerbrei 2000, Sauerbrei et al. 2004b) als Stopplösung bewährt. Peressigsäure wird bei der Reaktion mit Zystein unter Bildung von Disulfid-Brücken zwischen den Seitenketten in Essigsäure und Wasser zersetzt (siehe Abb. 9).

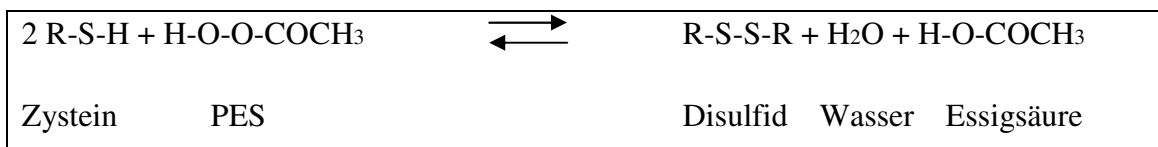


Abb. 9: Chemische Reaktion von Peressigsäure mit Zystein zu Essigsäure und Wasser unter Bildung eines Disulfids (R=Molekülrest)

Zur iodometrischen Titration der PES wurden 1 ml einer etwa 2%igen PES-Lösung mit 20 ml Eiswasser verdünnt. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml 20%iger Kaliumiodidlösung. Im Anschluss daran wurde mit 0,1 N Natriumthiosulfatlösung bis zur Entfärbung titriert und die Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$\text{Gehalt an PES in \%} = \frac{\text{verbrauchte ml } 0,1 \text{ N Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 3,8}{10 \times \text{Einwaage in ml}}$

Abb. 10: Formel zur Berechnung von Peressigsäurekonzentration nach iodometrischer Titration

3.2.6 Povidon-Jod

Povidon-Jod wurde aus dem kommerziell erhältlichen Betaisodona[®] (Mundipharma GmbH, Limburg) bezogen. Diese Stammlösung enthält einen 10%igen Anteil von verfügbarem Jod. Die für den Versuch benötigten Konzentrationen (siehe Tab. 3) wurden vor Versuchsbeginn durch Verdünnen mit sterilem A. bidest. hergestellt. Die Inaktivierung von PVP-Jod erfolgte mit Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₄), welches in vergleichbaren Studien benutzt wurde (Shimizu et al. 2002, Sauerbrei et al. 2006, Sauerbrei et al. 2004b). Die Wirkungsweise besteht in der Reduktion von Jod zu Jodid (Gottardi 1991). Nach Ablauf der Einwirkzeiten wurde eine 0,1 N Na₂S₂O₄ – Lösung im Verhältnis 2:1 mit der Virus-Substanz-Suspension vermischt.

3.3 Zellkulturen

Für die Suspensionsversuche wurden BGM – Zellen (MikroLab GmbH, Bremen) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine permanente Zelllinie, die aus dem Nierenepithel der grünen Meerkatze gewonnen wurde. Als Kulturmedium wurde EMEM mit 25 mM Hepes, w/o L-Glutamin, 10% fetalem Kälberserum (FKS) und Earl`s Balanced Salt Solution (BioWhitaker™, Verviers, Belgien) hinzugegeben. Die Zellen wurden zweimal pro Woche im Verhältnis 1:4 umgesetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte standardgemäß bei 37°C und 5% CO₂.

Zur Virusanzüchtung wurden die Zellen in 96-Well-Zellkulturplatten (TPP AG, Trasadingen, Schweiz) mit 200 µl Zellsuspension pro Kavität eingebracht. Dabei lagen die Zellen in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml vor. Nach 24stündiger Inkubation waren die Zellen zu einem Monolayer ausgewachsen (siehe Abb. 11).

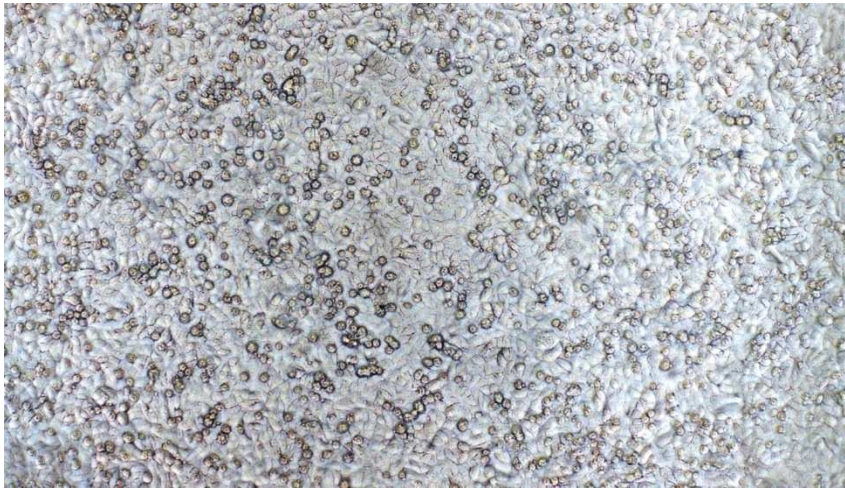


Abb. 11: BGM – Zellmonolayer nach 2tägiger Inkubation mit 60facher Vergrößerung und Phasenkontrast

3.4 Prüfviren

- Herkunft

Das PMV Typ 1 Impfstamm LSc-2ab (Sabin), ursprünglich im Besitz der Firma Chiron-Behring, wurde über die MikroLab GmbH, Bremen bezogen.

Das EV Typ 1 Stamm Farouk wurde durch die MikroLab GmbH, Bremen zur Verfügung gestellt.

- Bereitung der Virussuspensionen

Die Virusstämme wurden 2- bis 8-mal über BGM-Zellen passagiert. Das Kulturmedium wurde durch frisches EMEM ohne FKS ersetzt und ein 24 h alter Zellrasen einer T-75-Zellkulturflasche mit 0,5 ml Virussuspension beimpft. Danach erfolgte die Inkubation der Zellkulturen bei 37°C und 5% CO₂. Nach Eintreten des zytopathischen Effekts (cpE) wurde der Überstand der Zellkultur bei 943 x g (Varifuge 3.R, Heraeus Holding GmbH, Hanau) zentrifugiert, dessen Sediment in 5 ml EMEM gebracht und bei -80°C eingefroren. Nachdem es nochmals weitere zweimal aufgetaut und eingefroren worden war, wurde es bei 943 x g zentrifugiert. Der gewonnene Zellkulturüberstand wurde gemischt und diente zur Infektion von insgesamt 12 T-175-Flaschen mit BGM-Zellen, die 24 h zuvor eingesät worden waren. Diese Zellkulturflaschen wurden mit jeweils 1,5 ml Virussuspension beimpft. Nach dem Erreichen eines cpE von 75% bis 100%, wurden die infizierten Zellkulturen dreimal bei -80°C eingefroren und zwischenzeitlich kurz aufgetaut. Dem Auftauen folgte die mechanische Ablösung der Reste des Zellrasens durch Aufnahme in ca. 20 ml EMEM und das Abgießen des Überstandes in Zentrifugenröhrchen (50 ml PP-Test-Tubes). Der Zellkulturüberstand und die Zellkultursuspension wurden für 20 min bei 2.300 x g und 4°C zentrifugiert (Sorvall RT 6.000D, Du Pont de Nemours Deutschland GmbH, Bad Homburg). Anschließend wurde der gewonnene Überstand portioniert und in Kryoröhrchen bei -80°C gelagert oder zur Aufkonzentrierung in Zentrifugen-Röhrchen (Quick Seal™, 38 x 102 mm, Beckman Coulter, USA) überführt.

Mittels Ultrazentrifugation (Optima XL-70, Beckman Coulter, USA, Rotortyp 45-Ti) über 2 h bei 155.600 x g und 4°C wurde die Viruslösung konzentriert. Die Viruspellets wurden in 3,2 ml eiskalter PBS je Beckmann-Röhrchen aufgenommen. Danach wurde

die Suspension nochmals bei 943 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde ampulliert und bei -80°C eingefroren. Die Tab. 4 zeigt eine Übersicht über die Viren, welche in aufkonzentrierter Form bei der Testung der DM verwendet wurden.

Tab 4: Übersicht über die Prüfung von Desinfektionsmitteln mit aufkonzentrierten Virussuspensionen

Desinfektionsmittel	Virusstamm	Virustiter (log ₁₀)
Glutaraldehyd	PMV	9,8±0,46 bis 10,5±0,32
	EV	9,8±0,36 bis 10,7±0,38
Formaldehyd	PMV	10,7±0,38 bis 11,2±0,36
	EV	9,7±0,38 bis 11,1±0,26

Die Infektiosität der Virussuspensionen wurde mit Hilfe der TCID₅₀ in 96-Well-Zellkulturplatten bestimmt. Der daraus resultierende Virustiter wurde entsprechend der Endpunktmethode nach Spearman (Spearman 1908) und Kärber (Kärber 1931) ermittelt, wobei die Viruskonzentration auf 1 ml Virussuspension bezogen wurde. Einen Tag vor Versuchsbeginn waren die Zellkulturplatten mit BGM-Zellen beimpft worden. Eine logarithmische Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻¹¹ wurde erstellt, und pro Verdünnungsstufe wurden 8 Kavitäten mit jeweils 200 µl Viruslösung bestückt, nachdem das Wachstumsmedium (EMEM) entfernt worden war. Die Zellkulturen wurden hinsichtlich des cpE täglich mittels eines inversen Lichtmikroskops (Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena) begutachtet. Innerhalb weniger Tage kam es durch die Viruseinwirkung zur Ausbildung typischer zytopathischer Veränderung, die nach einer Woche 75 bis 100% des Zellrasens ausmachten (siehe Abb. 12 und 13).

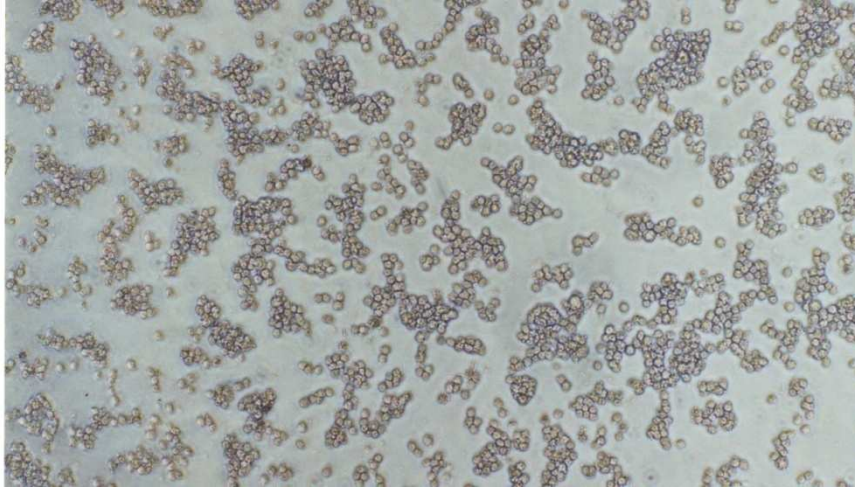


Abb. 12: Virusinduzierte zytopathische Effekte in BGM-Zellen 7 Tage nach Infektion mit dem Poliomyelitisvirus Typ 1 Stamm LSc-2ab, Vergrößerung 60 x, Phasenkontrast

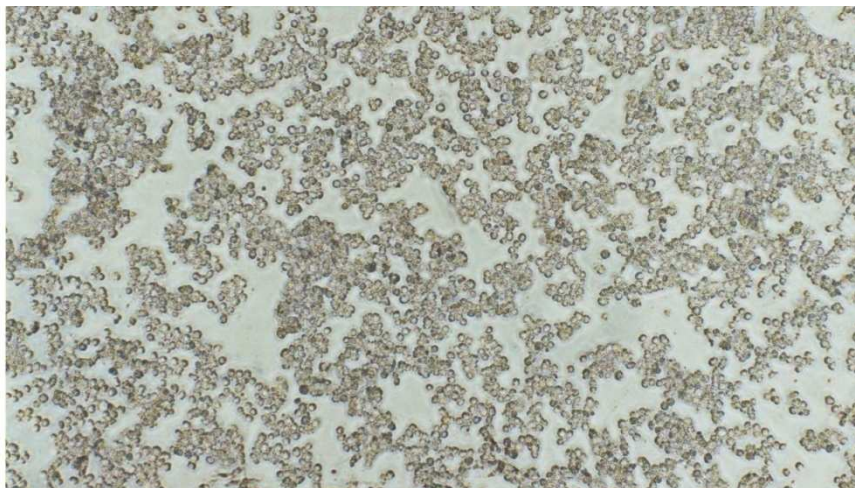


Abb. 13: Virusinduzierte zytopathische Effekte in BGM-Zellen 7 Tage nach Infektion mit dem ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk, Vergrößerung 60 x, Phasenkontrast

3.5 Quantitativer Suspensionsversuch

3.5.1 Versuchsdurchführung

Die Testung der Viruzidie erfolgte in Anlehnung an die „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (DVV und RKI 2005) als quantitativer Suspensionsversuch ohne und mit Eiweißbelastung unter Berücksichtigung der europäischen Norm (ECS 2006).

Vor Versuchsbeginn wurden Virussuspension (3.4), A. bidest., die Belastungslösungen „clean conditions“ und „dirty conditions“ sowie die DM-Lösung auf Zimmertemperatur erwärmt. Die zu testenden DM und Antiseptika wurden 1,25fach konzentrierter als die Testkonzentration vorbereitet. Jeweils 1,6 ml (8 Teile) des DM wurden bei $20 \pm 0,5$ °C unter Verwendung eines Thermoblocks mit 200 µl (1 Teil) A. bidest. bzw. 200 µl der Belastungssubstanzen „clean conditions“ oder „dirty conditions“ (3.1) gemischt. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl (1 Teil) Virussuspension, was den Beginn der Einwirkungszeit darstellte. Nach Ablauf der Einwirkzeiten für PES (Tab. 3) wurden 300 µl der Virus-Substanz-Suspension mit einer Virusverdünnung von 10^{-1} in bereits vorgegebene 300 µl der Stopplösung Zysteinhydrochlorid (pH 7,0; siehe 3.1) gebracht und für 5 min bei 4°C inkubiert. Die Konzentration der Stopplösung entsprach der doppelten der aktuellen PES-Konzentration (siehe 3.2.5). Die Inaktivierung von PVP-Jod erfolgte nach Ablauf der Einwirkzeiten mit Natriumthiosulfat (3.2.6). Hierfür wurden 300 µl der Virus-Substanz-Suspension, welche einer Virusverdünnung von 10^{-1} entsprach, in bereits vorbereitete 300 µl der Stopplösung befördert. Bei Versuchen mit GA, FA, Ethanol und Isopropanol folgte unmittelbar nach Ablauf der Einwirkzeiten (siehe Tab. 3) das Anlegen einer logarithmischen Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 (3.5.2), womit die Desinfektionsmittelwirkung gestoppt wurde. Die Auswertung der Zellkulturen bezüglich der Ausbildung von cpE erfolgte im Abstand vom 1. bis zum 7. Tag nach Testbeginn, wie bereits unter 3.4 beschrieben.

3.5.2 Bestimmung der Infektiosität

Die Bestimmung der Infektiosität der Virussuspension nach Einwirkung des DM erfolgte mittels Bestimmung der TCID₅₀ als Einverdünnungsmethode (quantaler Test) im Mikroplatten-Zellkulturtest (siehe 3.4). Nach Neutralisation der PES und des PVP-Jod wurden 600 µl der hergestellten Testlösungen mit vorgegebenen 2,4 ml EMEM gemischt, so dass eine Verdünnung von 10^{-2} entstand. Es folgte das Anlegen einer logarithmischen Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10^{-3} bis 10^{-10} . Anschließend wurden 200 µl jeder Verdünnungsstufe in jeweils 8 Vertiefungen der 96-Well-Kulturplatten appliziert und bei 36°C sowie bei 5% CO₂ inkubiert. Die Platten waren 24 h zuvor mit BGM-Zellen beschickt worden.

3.5.3 Kontroll- und Vergleichsversuche

Alle Kontroll- und Vergleichsversuche wurden gemäß der „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen DM auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (DVV und RKI 2005) durchgeführt.

- Viruskontrolle

Die mit jedem Einzelversuch verbundene Viruskontrolle ermöglichte die Bestimmung des Ausgangstiters der Testviren, welcher für die Berechnung der RF notwendig war. Zugleich gestattete sie die Prüfung der Virusstabilität. Für diesen Versuchsansatz wurden 800 µl A. bidest. mit 100 µl A. bidest. bzw. 100 µl der Belastungsansätze „clean conditions“ oder „dirty conditions“ sowie 100 µl Viruslösung vermischt. Es folgte das Anlegen einer logarithmischen Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 bis zu einer Verdünnung von 10^{-10} (s. 3.5.2).

- Toxizitätskontrolle

Die Toxizitätskontrolle des DM wurde zur Unterscheidung von virusbedingten oder zelltoxischen Veränderungen, welche durch DM verursacht werden können, durchgeführt. Dafür wurden 800 µl der Testlösung, 100 µl A. bidest. plus 100 µl A. bidest. bzw. die Belastungsansätze „clean conditions“ oder „dirty conditions“ gemischt und eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-4} angelegt. Im Anschluss daran wurden die Verdünnungsreihen, wie unter 3.5.2 beschrieben, auf Zellkulturen gebracht.

- Interferenzkontrolle

Die Interferenzkontrolle diente dem Nachweis, ob die Zellsuszeptibilität für die Infektion mit Virus nicht durch die Anwesenheit des DM negativ beeinflusst wurde. Hierzu wurden 100 µl A. bidest. plus 100 µl A. bidest. bzw. die Belastungslösungen für „clean conditions“ oder „dirty conditions“ mit 800 µl DM versetzt. Danach wurde die Zellkultur für 1 h mit der Lösung beimpft und nach Ablauf der Einwirkzeit entfernt. Anschließend wurde die Zellkultur mit der Virussuspension in einer Verdünnung von 10^{-2} bis 10^{-10} inkubiert und der Virustiter bestimmt. Lag keine negative Beeinträchtigung der Zellkultur durch das DM vor, musste der Virustiter im Vergleich mit dem der Viruskontrolle eine maximale Differenz von 0,5 \log_{10} aufweisen.

- Nachwirkungskontrolle

Die Nachwirkungskontrolle wurde durchgeführt, um auszuschließen, dass eine methodisch bedingte unkontrollierte Nachwirkung des DM über die Einwirkzeit hinaus vorgelegen hat. Dafür wurden 100 µl (1 Teil) Virussuspension, 100 µl (1 Teil) A. bidest. bzw. die Belastungsansätze „clean conditions“ oder „dirty conditions“ und 800 µl (8 Teile) Testsubstanz gemischt und für die Zeitspanne zwischen Beendigung der Einwirkzeit und Anlegen einer Verdünnungsreihe im Eisbad inkubiert. Wurden PES oder PVP-Jod als Testsubstanzen verwendet, wurden diese vorher, wie unter 3.5.1 beschrieben, mittels Stopplösungen neutralisiert. Nachfolgend wurden Verdünnungsreihen angelegt und eine Titerbestimmung vorgenommen. Auf eine vernachlässigbare oder nicht vorhandene Nachwirkung des DM konnte geschlussfolgert werden, wenn sich eine Differenz des Titters im Vergleich zur Viruskontrolle von $\leq 0,5 \log_{10}$ ergab.

- Formaldehydkontrolle

Dieser Kontrollversuch wurde durchgeführt, um zu ermitteln, ob die Prüfviren eine Resistenzentwicklung gegenüber FA zeigten und die Durchführung des Versuchs regelrecht erfolgte. Für diesen Versuch wurde 0,7% FA bei Einwirkzeiten von 30, 60, 120 und 240 min getestet. Die Testsubstanz bestand aus: 1,6 ml FA (8 Teile) plus 200 µl (1 Teil) Virus plus 200 µl (1 Teil) A. bidest. Das weitere Procedere entsprach dem unter 3.5.2 beschriebenen.

3.6 Statistische Analyse

Die biometrische Auswertung der Versuche erfolgte nach der „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (DVV und RKI 2005). Der logarithmische Infektionstiter wurde nach Spearman (Spearman 1908) und Kärber (Kärber 1931) in $TCID_{50}/ml$ berechnet. Die Standardabweichung (SD) wurde wie in Tab. 5 definiert. Das 95% Konfidenzintervall des Titers entsprach der doppelten SD. Aus den Ergebnissen von jeweils 3 gleichen Versuchsansätzen wurde der RF ermittelt, um die Wirksamkeit der zu prüfenden Suspension festzustellen. Dieser berechnete sich aus der Differenz von Infektiositätstiter und dem Virustiter, welcher nach der Einwirkung des Prüfmittels berechnet wurde. Aus 3 Einzelergebnissen wurden der durchschnittliche Titer der Viruskontrolle und der durchschnittliche Titer für jede Einwirkzeit sowie der mRF über das arithmetische Mittel bestimmt. Deren 95% Konfidenzintervalle wurden nach der Formel in nachfolgend aufgeführter Tabelle berechnet. Von einer ausreichenden Viruzidie konnte bei einer Titerreduktion von mindestens $4 \log_{10}$ ausgegangen werden. Unterschiede der RF, unter gleichen Testbedingungen, wurden mit dem t-Test unter Annahme einer ungefähren Normalverteilung analysiert. Das Signifikanzniveau war 0,05.

Tab. 5: Verwendete Formeln zur statistischen Analyse, wobei m = Logarithmus des Titers bezogen auf das Testvolumen; x = Logarithmus der kleinsten Verdünnungsstufe, bei der alle 8 Kavitäten positiv waren; d = Logarithmus des Verdünnungsfaktors pi = Reaktionsrate; s = Standardabweichung; n = Anzahl der eingesetzten Testobjekte pro Verdünnung; 2sk = 95% Konfidenzintervall der Kontroll-Titration des Versuchsansatzes; 2sv = 95% Konfidenzintervall der Restvirus-Titration und KRf1, KRf2, KRf3 = 95% Konfidenzintervall des 1. - 3. Versuchsansatzes

Parameter	Formel
Titerberechnung	$m = x + \frac{d}{2} - d \sum p_i$
Standardabweichung der Virustiter	$S = \sqrt{d^2 \sum \{p_i(1 - p_i)/(n - 1)\}}$
95% Konfidenzintervall des Reduktionsfaktors	$KRf = \sqrt{(2sk)^2 + (2sv)^2}$
95% Konfidenzintervall der Durchschnittswerte	$K_{mRF} = \frac{1}{3} \sqrt{(KRf1)^2 + (KRf2)^2 + (KRf3)^2}$

Kapitel 4: Ergebnisse

4.1 Bewertung der Kontrollexperimente

Nach den Prüfanforderungen der „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (DVV und RKI 2005) entsprachen die Viruskontrolltiter mit einem 95% Konfidenzintervall von stets $\leq 0,5 \log_{10}$ dessen Anforderungen. Die zum Versuch parallel durchgeführten Viruskontrollen mit den Belastungslösungen „clean conditions“ und „dirty condotions“, entsprachen ebenfalls den Anforderungen. Die Titer der Viruskontrolle ohne Aufkonzentrieren des Virus lagen in einem Bereich von $7,50 \pm 0,32$ bis $9,30 \pm 0,26 \log_{10}$ vor. Unter Verwendung von Virus, das mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert worden war, nahmen die Viruskontrolltiter Werte von $9,70 \pm 0,38$ bis $11,10 \pm 0,26 \log_{10}$ an (siehe Tab. 4, Seite 25). Die Zellkontrollmonolayer waren bis zum Tag der Endablesung intakt und wiesen eine einheitliche Struktur auf. In der Nachwirkungskontrolle konnte im Vergleich zur Viruskontrolle bezüglich des Virustiters stets eine Differenz von $\leq 0,5 \log_{10}$ ermittelt werden. Hieraus kann von einer vernachlässigbaren oder nicht vorhandenen Nachwirkung des DM über die gewählten Expositionszeiten hinaus ausgegangen werden. Daraus folgt auch, dass die viruziden Eigenschaften von PES und PVP-Jod durch Neutralisation von Zysteinhydrochlorid bzw. Natriumthiosulfat zuverlässig aufgehoben wurden. Bei den durchgeführten Interferenzkontrollen zeigte sich stets eine Titerdifferenz von $\leq 0,5 \log_{10}$ im Vergleich zur Viruskontrolle. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Zellsuszeptibilität durch die Anwesenheit des entsprechenden DM nicht negativ beeinflusst wurde. Die zu prüfenden Substanzen GA, PES, Isopropanol, Ethanol, PVP-Jod und FA zeigten für die eingesetzten BGM-Zellen eine mehr oder weniger ausgeprägte Zytotoxizität. Diese lag maximal bei einer Virusverdünnung von 10^{-4} . Auf Grund der Zytotoxizität konnten die Titer plus 95% Konfidenzintervall bei einigen Prüfviren nach Einwirkung des DM nicht exakt bestimmt werden. Hier wurden die Titer mit \leq und die RF mit \geq angegeben. Alle Angaben wurden auf 1 ml Virussuspension bezogen.

Gemäß der „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (DVV und RKI 2005) wurden Suspensionskontrollversuche mit 0,7%igem FA gegen die Testviren durchgeführt. Gegenüber dem EV konnte nach 60minütiger und bei dem PMV nach 120minütiger Einwirkzeit eine Titerreduktion um mindestens 4 Titerstufen bei allen Versuchen erreicht werden.

4.2 Glutar- und Formaldehyd

4.2.1 Glutaraldehyd 0,5%

Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse wird in Tab. 6 (Seite 42) wiedergegeben. Toxische Veränderungen der Zellkultur konnten bei der Anwendung von 0,5% GA bis zu einer Virusverdünnungsstufe von 10^{-3} in allen Versuchen beobachtet werden. Den Verlauf der Virustiter unter Einwirkung von 0,5% GA ohne und mit Belastung in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit zeigen die Abb. 14-16.

- Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab

In den Einzelversuchen mit dem PMV wurden ohne Eiweißbelastung Kontrolltiter von $8,70 \pm 0,52$ bis $9,10 \pm 0,42$ (mittlerer Virustiter, mVT $8,93 \pm 0,25$) \log_{10} erreicht. Nach 5 min Einwirkzeit ergaben sich RF von $3,50 \pm 0,52$ bis $3,90 \pm 0,41$ ($mRF \geq 3,67$) \log_{10} . Nach 10 min lagen die RF bei $\geq 4,50$ ($mRF \geq 4,70$) \log_{10} , was auch den Ergebnissen nach 30 und 60 min entsprach. Unter der Eiweißbelastung „clean conditions“ wurden in den Einzelversuchen Kontrolltiter von $8,10 \pm 0,26$ bis $8,50 \pm 0,32$ (mVT $8,30 \pm 0,26$) \log_{10} erreicht. Für alle Einwirkzeiten von 5, 10, 30 und 60 min ergaben sich RF von $\geq 3,90$ ($mRF \geq 4,10$) \log_{10} . Bei weiteren Versuchen mit der Eiweißbelastung „dirty conditions“ resultierten Kontrolltiter von $8,60 \pm 0,26$ bis $9,50 \pm 0,32$ (mVT $9,13 \pm 0,18$) \log_{10} . Nach einer Einwirkdauer von 5 min wurden RF von $3,50 \pm 0,61$ bis $4,40 \pm 0,41$ ($mRF 4,00 \pm 0,26$) \log_{10} ermittelt. Reduktionsfaktoren von $3,50 \pm 0,45$ und $\leq 4,50$ ($mRF 4,43 \pm 0,29$) \log_{10} resultierten aus 10 min Einwirkung. Titer von je $\leq 4,20$ \log_{10} errechneten sich für die Zeiten von 30 und 60 min. Die RF für diese Zeiten betrugen alle $\geq 4,5$ ($mRF \geq 4,93$) \log_{10} .

- *ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk*

Ohne Eiweißbelastung ergaben sich Kontrolltiter von $7,60 \pm 0,42$ bis $9,0 \pm 0,32$ (mVT $8,20 \pm 0,24$) \log_{10} . Fünf Minuten nach Versuchsstart wurden RF von $1,50 \pm 0,48$ bis $2,30 \pm 0,67$ (mRF $1,87 \pm 0,35$) \log_{10} ermittelt. Aus einer Einwirkphase von 10 min resultierten RF von $1,20 \pm 0,53$ bis $2,30 \pm 0,67$ (mRF $1,80 \pm 0,35$) \log_{10} . Nach einer halben Stunde Einwirkdauer wurden RF zwischen $2,40 \pm 0,53$ bis $2,80 \pm 0,32$ (mRF $2,90 \pm 0,29$) \log_{10} ermittelt. Das Ergebnis aus 60 min Einwirkdauer waren RF von $2,70 \pm 0,55$ bis $3,30 \pm 0,63$ (mRF $3,03 \pm 0,32$) \log_{10} . Unter der Eiweißbelastung „clean conditions“ ergaben sich Kontrolltiter von $7,00 \pm 0,44$ bis $8,10 \pm 0,26$ (mVT $7,57 \pm 0,21$) \log_{10} . Nach 5 min Einwirkzeit lagen die RF zwischen $0,00 \pm 0,62$ und $0,90 \pm 0,44$ (mRF $0,40 \pm 0,29$) \log_{10} . Bei einer Einwirkdauer von 10 min wurden RF mit Werten von 0 bis $2,00 \pm 0,37$ (mRF $1,17 \pm 0,32$) \log_{10} errechnet. Dreißig Minuten nach Versuchsstart lagen die RF zwischen $1,50 \pm 0,54$ und $3,04 \pm 0,46$ (mRF $2,27 \pm 0,29$) \log_{10} . Die nach 60 min errechneten RF lagen im Intervall von $2,02 \pm 0,57$ bis $3,40 \pm 0,46$ (mRF $2,87 \pm 0,30$) \log_{10} . Mit der Belastungslösung „dirty conditions“ wurden nach 5 min Einwirkdauer RF zwischen $0,20 \pm 0,56$ bis $1,80 \pm 0,57$ (mRF $0,57 \pm 0,34$) \log_{10} erreicht. Nach 10 min Einwirkdauer wurden RF von $0,10 \pm 0,63$ bis $1,40 \pm 0,61$ (mRF $0,70 \pm 0,35$) \log_{10} errechnet. Für eine Einwirkdauer der Testsubstanz von 30 min ergaben sich RF von $0,70 \pm 0,56$ bis $1,60 \pm 0,51$ (mRF $1,10 \pm 0,31$) \log_{10} . Reduktionsfaktoren von $0,90 \pm 0,71$ bis $2,00 \pm 0,58$ (mRF $1,50 \pm 0,36$) \log_{10} resultierten aus 60 min Einwirkung des DM. Die Titer der Viruskontrolle lagen zwischen $7,20 \pm 0,46$ bis $7,70 \pm 0,44$ (mVT $7,37 \pm 0,26$) \log_{10} und $7,40 \pm 0,26$ bis $9,3 \pm 0,32$ (mVT $8,93 \pm 0,25$) \log_{10} .

- Statistische Analyse

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den mRF, die mit PMV und EV erzielt werden konnten, bestanden unter Verwendung von 0,5% GA über 5, 10, 30 und 60 min ohne Belastungsansatz, über 5, 10 und 60 min mit der Belastung „clean conditions“ sowie über 5, 10, 30 und 60 min mit der Belastung „dirty conditions“.

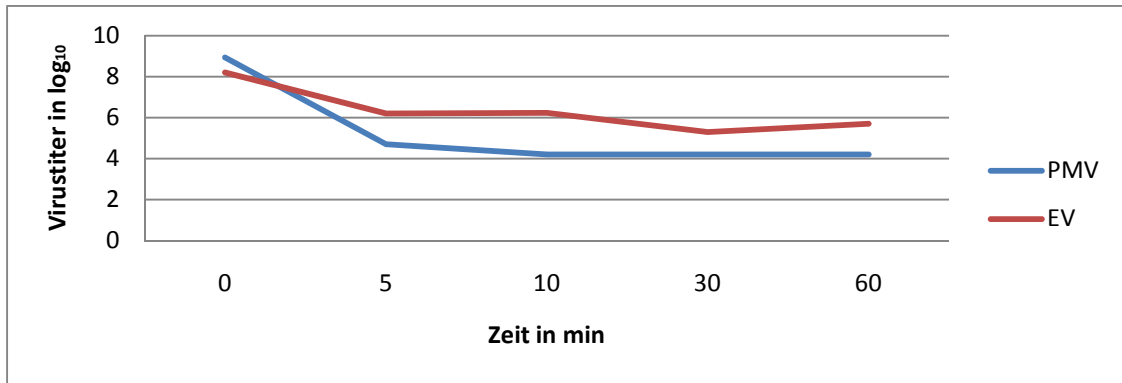


Abb. 14: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0.5% Glutaraldehyd ohne Eiweißbelastung

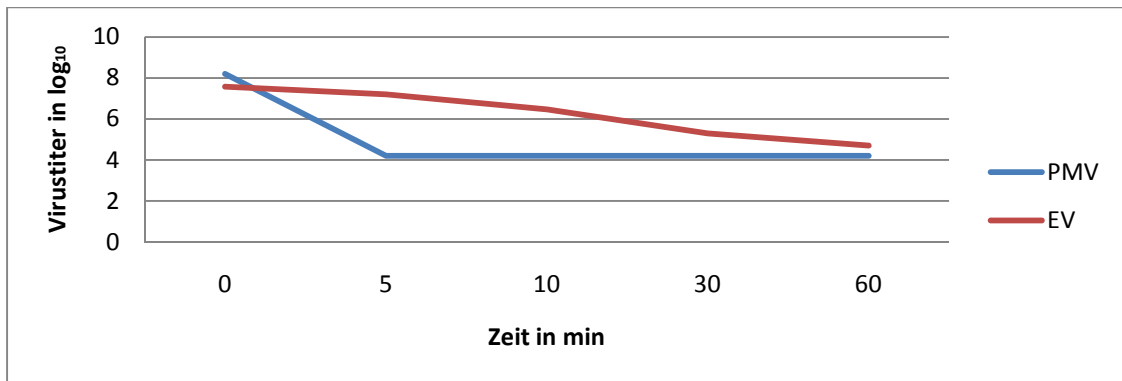


Abb. 15: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0.5% Glutaraldehyd unter „clean conditions“

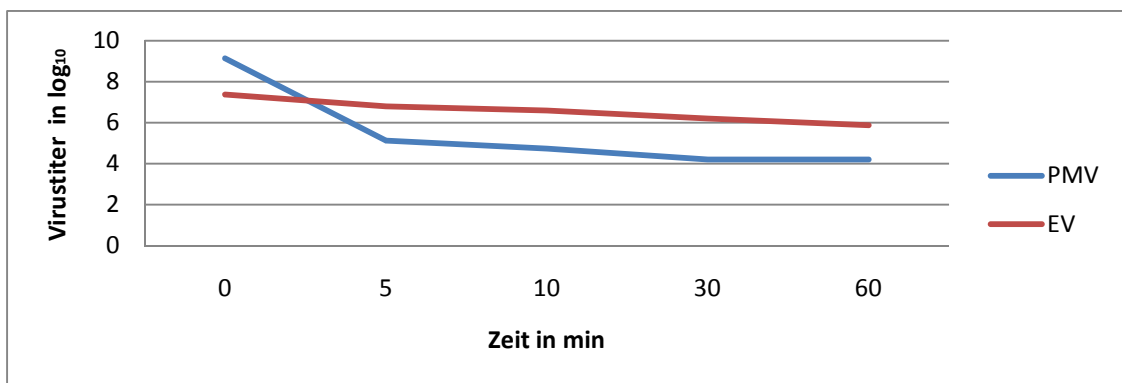


Abb. 16: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) Einwirkung von 0.5% Glutaraldehyd unter „dirty conditions“

4.2.2 Glutaraldehyd 2%

Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse wird in Tab. 6 (Seite 42) wiedergegeben. Toxische Veränderungen lagen bis zu einer Virusverdünnungsstufe von 10^{-4} in allen Versuchen gegenüber 2%igem GA vor. Dies erforderte die Verwendung einer aufkonzentrierten Virussuspension. Den Verlauf der Virustiter unter Einwirkung von 2% GA ohne und mit Belastung zeigen die Abb. 17-19.

- Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab

Ohne Belastungslösung wurden Viren mit einem Titer zwischen $8,30 \pm 0,26$ und $10,0 \pm 0,00$ (mVT $9,37 \pm 0,18$) \log_{10} verwendet. Wegen der ausgeprägten Toxizität von GA konnten in allen 3 Versuchsansätzen mit Einwirkzeiten von 5, 10, 30 und 60 min Virustiter mit $\leq 5,20 \log_{10}$ bestimmt werden. Daraus resultierten RF zwischen $\geq 3,10$ und $\geq 5,20$ (mRF $\geq 4,17$) \log_{10} . Bei den Versuchen mit der Belastungslösung „clean conditions“ lagen Kontrolltiter von $8,30 \pm 0,26$ bis $10,30 \pm 0,42$ (mVT $9,63 \pm 0,19$) \log_{10} und Titerreduktionswerte zwischen $\geq 3,10$ bis $\geq 5,10$ (mRF $\geq 4,43$) \log_{10} für jede der Einwirkzeiten von 5 bis 60 min vor. Unter „dirty conditions“ ergaben sich Kontrolltiter von $8,50 \pm 0,32$ bis $10,50 \pm 0,32$ (mVT $9,77 \pm 0,17$) \log_{10} , wobei RF zwischen $\geq 3,30$ bis $\geq 5,20$ (mRF $\geq 4,57$) \log_{10} für 5, 10, 30 und 60 min ermittelt wurden.

- ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk

Ohne Eiweißbelastung wurden Kontrolltiter von $9,80 \pm 0,36$ bis $10,70 \pm 0,38$ (mVT $10,53 \pm 0,24$) \log_{10} ermittelt. Nach der Einwirkung von 2% GA über einen Zeitraum von 5 min wurden RF zwischen $0,00 \pm 0,51$ und $2,10 \pm 0,51$ (mRF $1,27 \pm 0,32$) \log_{10} erreicht. Nach 10 min waren RF zwischen $0,00 \pm 0,51$ bis $3,00 \pm 0,54$ (mRF $1,77 \pm 0,28$) \log_{10} nachweisbar. Reduktionsfaktoren von $2,20 \pm 0,57$ bis $4,20 \pm 0,50$ (mRF $3,50 \pm 0,30$) \log_{10} ergaben sich nach 30 min. Nach 60 min wurden die RF zwischen $3,50 \pm 0,62$ und $5,40 \pm 0,46$ (mRF $4,40 \pm 0,30$) \log_{10} bestimmt. Die Versuche unter „clean conditions“ ergaben nach 5 min RF von 0 bis $2,10 \pm 0,52$ (mRF $1,03 \pm 0,27$) \log_{10} , nach 10 min von $0,30 \pm 0,44$ bis $2,20 \pm 0,51$ (mRF $1,67 \pm 0,26$) \log_{10} , nach 30 min von $3,30 \pm 0,41$ bis $4,10 \pm 0,52$ (mRF $3,73 \pm 0,29$) \log_{10} und nach 60 min RF zwischen $4,30 \pm 0,44$, $\geq 4,60$ und $5,00 \pm 0,54$ (mRF $\geq 4,63$) \log_{10} . Die Titer der Viruskontrolle lagen zwischen $9,80 \pm 0,36$ und $10,50 \pm 0,44$ (mVT $10,13 \pm 0,21$) \log_{10} . Unter Anwendung der Belastungslösung „dirty conditions“ konnten nach 5 min RF von $0,40 \pm 0,50$ bis $1,40 \pm 0,36$ (mRF

1,00±0,26) log₁₀, nach 10 min von 0,70±0,50 bis 2,30±0,41 (mRF 1,67±0,28) log₁₀, nach 30 min von 2,50±0,38 bis 3,80±0,48 (mRF 3,07±0,22) log₁₀ und nach 60 min zwischen 3,90±0,26, 4,20±0,38 und ≥4,60 (mRF ≥4,23) log₁₀ errechnet werden. Die Titer der Viruskontrolle reichten von 9,80±0,36 bis 10,70±0,38 (mVT 10,23±0,17) log₁₀.

- Statistische Analyse

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen dem PMV und EV nach Verwendung von 2% GA konnten bei 5 min Einwirkdauer unter allen Belastungen und nach 10 min Einwirkungszeit unter den Belastungen „clean“ und „dirty conditions“ festgestellt werden.

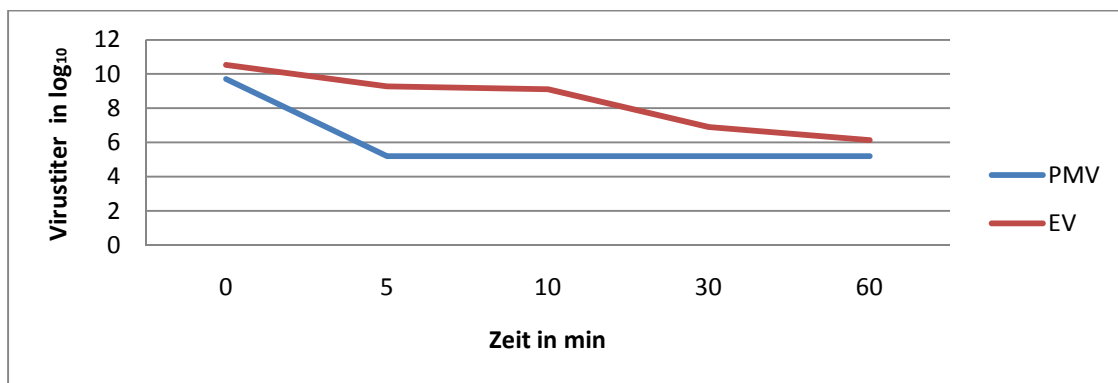


Abb. 17: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 2% Glutaraldehyd ohne Eiweißbelastung

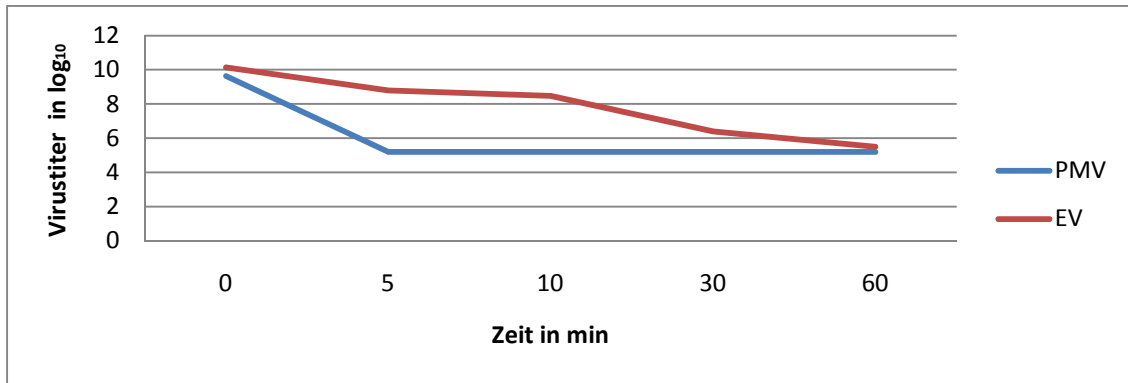


Abb. 18: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 2% Glutaraldehyd unter „clean conditions“

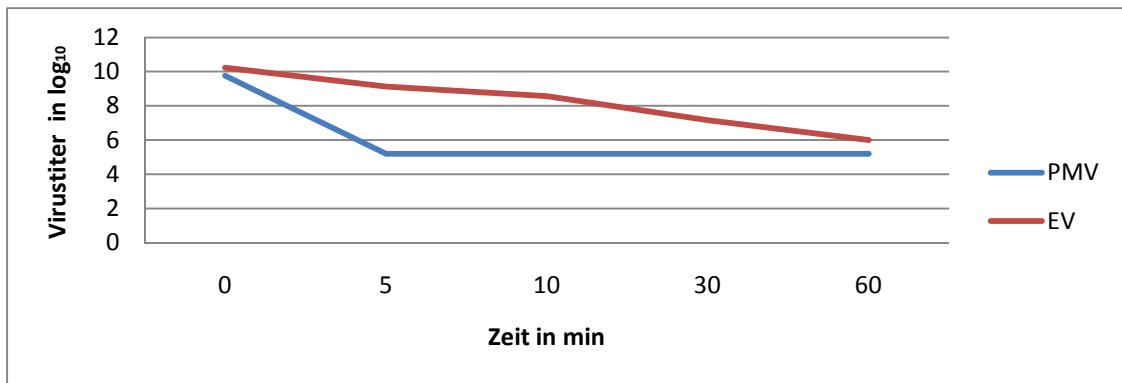


Abb. 19: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 2% Glutaraldehyd unter „dirty conditions“

4.2.3 Formaldehyd 1%

Die Ergebnisse werden in Tab. 6 (Seite 42) zusammengefasst. Bei der Anwendung von FA in einer Konzentration von 1% traten bis zu einer Virusverdünnung von 10^{-3} zelltoxische Veränderungen auf. Den Verlauf der Virustiter unter Einwirkung von 1% FA ohne und mit Belastung zeigen die Abb. 20-22.

- Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab

Bei den durchgeführten Versuchen ohne Eiweißlösung konnten Kontrolltiter zwischen $10,70 \pm 0,38$ und $11,00 \pm 0,32$ (mVT $10,93 \pm 0,19$) \log_{10} bestimmt werden. Nach 30 min lagen die RF zwischen $2,80 \pm 0,56$ und $4,40 \pm 0,46$ (mRF $3,37 \pm 0,25$) \log_{10} . Eine Stunde nach Versuchsbeginn konnten RF von $4,50 \pm 0,45$ bis $5,90 \pm 0,52$ (mRF $5,43 \pm 0,25$) \log_{10}

erreicht werden. Für die Einwirkzeiten von 120 und 240 min lagen die RF in allen Versuchen bei $\geq 6,50$ ($mRF \geq 6,73$) \log_{10} . Mit der Belastungslösung „clean conditions“ ergaben sich Kontrolltiter zwischen $10,70 \pm 0,38$ und $11,20 \pm 0,36$ (mVT $11,03 \pm 0,17$) \log_{10} . Bei einer Einwirkungszeit von 30 min wurden RF von $3,00 \pm 0,36$ bis $4,50 \pm 0,38$ (mRF $3,87 \pm 0,24$) \log_{10} erreicht. Bei 60 min Einwirkdauer errechneten sich RF von $4,00 \pm 0,36$ bis $6,00 \pm 0,0$ (mRF $5,17 \pm 0,17$) \log_{10} . Für 120 und 240 min konnten RF von je $\geq 6,50$ ($mRF \geq 6,83$) \log_{10} ermittelt werden. Aus den Versuchen unter Verwenden der Belastungslösung „dirty conditions“ resultierten Kontrolltiter im Bereich von $10,70 \pm 0,38$ bis $11,00 \pm 0,32$ (mVT $10,93 \pm 0,19$) \log_{10} . Bei der Einwirkzeit von 30 min wurden RF von $1,70 \pm 0,41$ bis $2,00 \pm 0,54$ (mRF $1,87 \pm 0,24$) \log_{10} festgestellt. Nach 60 min lagen die RF zwischen $2,80 \pm 0,32$ und $5,00 \pm 0,54$ (mRF $3,73 \pm 0,26$) \log_{10} , nach 120 min zwischen $6,00 \pm 0,54$ und $\geq 6,90$ ($mRF \geq 6,40$) \log_{10} sowie nach 240 min bei $\geq 6,50$ ($mRF \geq 6,73$) \log_{10} .

- *ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk*

Ohne Eiweißbelastung konnten Kontrolltiter von $10,30 \pm 0,26$ bis $10,70 \pm 0,38$ (mVT $10,53 \pm 0,19$) \log_{10} errechnet werden. Die RF, die sich nach 30 min Einwirkdauer der Testsubstanz ergaben, lagen zwischen $5,10 \pm 0,26$ und $5,40 \pm 0,46$ (mRF $5,20 \pm 0,24$) \log_{10} . Nach 60 min ergaben sich RF von $5,20 \pm 0,37$ bis $5,50 \pm 0,38$ (mRF $5,37 \pm 0,21$) \log_{10} . Für die übrigen Zeiten von 120 und 240 min konnten die RF mit $\geq 6,10$ ($mRF \geq 6,33$) \log_{10} pro Versuch bestimmt werden. Mit der Eiweißbelastung „clean conditions“ lagen die Kontrolltiter bei $10,80 \pm 0,36$ und $11,10 \pm 0,26$ (mRF $11,00 \pm 0,17$) \log_{10} . Bei einer Einwirkungszeit von 30 min wurden RF von $4,10 \pm 0,48$ bis $4,60 \pm 0,46$ (mRF $4,40 \pm 0,28$) \log_{10} und nach 60 min zwischen $5,60 \pm 0,36$ bis $6,10 \pm 0,41$ (mRF $5,90 \pm 0,22$) \log_{10} erzielt. Bei den weiteren Einwirkzeiten von 120 und 240 min wurden RF von $\geq 6,60$ ($mRF \geq 6,80$) \log_{10} bestimmt. Mit der Belastungslösung „dirty conditions“ ergaben sich Kontrolltiter von $9,70 \pm 0,38$ bis $11,10 \pm 0,26$ (mVT $10,47 \pm 0,19$) \log_{10} . Reduktionsfaktoren von $2,50 \pm 0,38$ bis $4,40 \pm 0,46$ (mRF $3,27 \pm 0,26$) \log_{10} resultierten aus 30 min Einwirkung sowie von $3,90 \pm 0,52$ bis $5,90 \pm 0,46$ (mRF $5,07 \pm 0,26$) \log_{10} aus 60 min Einwirkung der Testsubstanz. Für die restlichen Zeiten von 120 und 240 min lagen die RF bei $\geq 5,50$ ($mRF \geq 6,20$) \log_{10} .

- Statistische Analyse

Statistisch signifikante Ergebnisse ergaben sich bei den Versuchen mit 1% FA sowie PMV und EV als Testviren nur bei einer Einwirkdauer von 30 min ohne Belastungslösung.

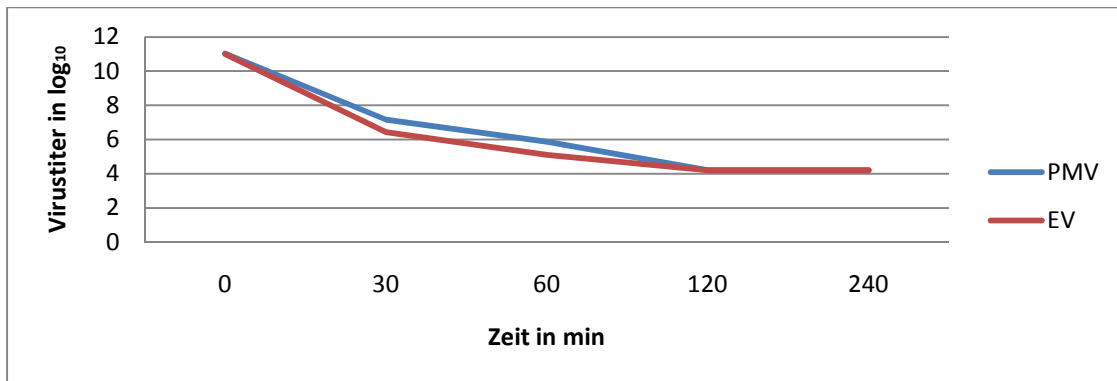


Abb. 20: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 1% Formaldehyd ohne Eiweißbelastung

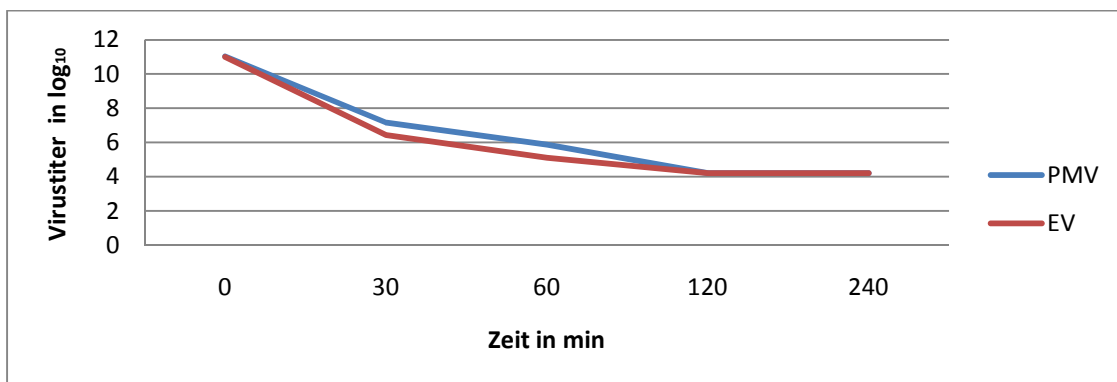


Abb. 21: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 1% Formaldehyd unter „clean conditions“

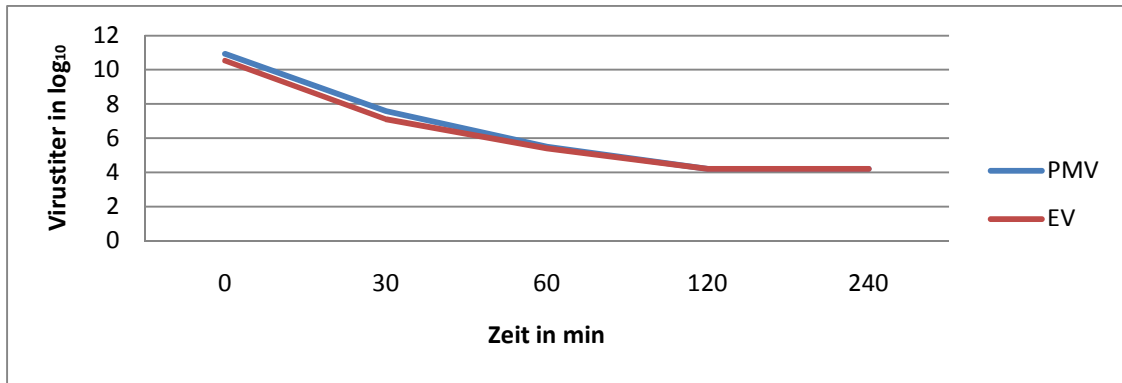


Abb. 22: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 1% Formaldehyd unter „dirty conditions“

Tab. 6. Zusammenfassende Darstellung der viruziden Wirksamkeit von Glutaraldehyd und Formaldehyd gegenüber Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk. Daten basieren auf dem arithmetischen Mittel aus 3 unabhängigen Einzelversuchen

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkdauer (min)	Viruskontrolle (log ₁₀) und Reduktionsfaktor in log ₁₀ (fett)						Statistische Signifikanz (p-value) n.s. = nicht signifikant		
			Poliovirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab			ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk					
			A. bidest.	Clean conditions	Dirty conditions	A. bidest.	Clean conditions	Dirty conditions	A. bidest.	Clean conditions	Dirty conditions
Glutaraldehyd	0,5	5	8,93±0,25 ≥3,67	8,30±0,26 ≥4,10	9,13±0,18 4,00±0,26	8,20±0,24 1,87±0,35	7,57±0,21 0,40±0,29	7,37±0,26 0,57±0,34	0,002	<0,001	0,001
		10	8,93±0,25 ≥4,70	8,30±0,26 ≥4,10	9,13±0,18 4,43±0,29	8,20±0,24 1,80±0,35	7,57±0,21 1,17±0,32	8,93±0,25 0,70±0,35	0,001	0,035	0,001
		30	8,93±0,25 ≥4,73	8,30±0,26 ≥4,10	9,13±0,18 ≥4,93	8,20±0,24 2,90±0,29	7,57±0,21 2,27±0,29	8,93±0,25 1,10±0,31	0,006	n.s.	<0,001
		60	8,93±0,25 ≥4,73	8,30±0,26 ≥4,10	9,13±0,18 ≥4,97	8,20±0,24 3,03±0,32	7,57±0,21 2,87±0,30	8,93±0,25 1,50±0,36	0,001	0,029	0,001
	2,0	5	9,37±0,18 ≥4,17	9,63±0,19 ≥4,43	9,77±0,17 ≥4,57	10,53±0,24 1,27±0,32	10,13±0,21 1,03±0,27	10,23±0,17 1,00±0,26	0,026	0,020	0,007
		10	9,37±0,18 ≥4,17	9,63±0,19 ≥4,43	9,77±0,17 ≥4,57	10,50±0,24 1,77±0,28	10,13±0,21 1,67±0,26	10,23±0,17 1,67±0,28	n.s.	0,045	0,022
		30	9,37±0,18 ≥4,17	9,63±0,19 ≥4,43	9,77±0,17 ≥4,57	10,53±0,24 3,50±0,30	10,13±0,21 3,73±0,29	10,23±0,17 3,07±0,22	n.s.	n.s.	n.s.
		60	9,37±0,18 ≥4,17	9,63±0,19 ≥4,43	9,77±0,17 ≥4,57	10,53±0,24 4,40±0,30	10,53±0,24 ≥4,63	10,23±0,17 ≥4,23	n.s.	n.s.	n.s.
Formaldehyd	1,0	30	10,93±0,19 3,37±0,25	11,03±0,17 3,87±0,24	10,93±0,19 1,87±0,24	10,53±0,19 5,20±0,24	11,00±0,17 4,40±0,28	10,47±0,19 3,27±0,26	0,025	n.s.	n.s.
		60	10,93±0,19 5,43±0,25	11,03±0,17 5,17±0,17	10,93±0,19 3,73±0,26	10,53±0,19 5,37±0,21	11,00±0,17 5,90±0,22	10,47±0,19 5,07±0,26	n.s.	n.s.	n.s.
		120	10,93±0,19 ≥6,73	11,03±0,17 ≥6,83	10,93±0,19 ≥6,40	10,53±0,19 ≥6,33	11,00±0,17 ≥6,80	10,47±0,19 ≥6,20	n.s.	n.s.	n.s.
		240	10,93±0,19 ≥6,73	11,03±0,17 ≥6,83	10,93±0,19 ≥6,73	10,53±0,19 ≥6,33	11,00±0,17 ≥6,80	10,47±0,19 ≥6,20	n.s.	n.s.	n.s.

4.3 Alkohole

Eine zusammenfassende Darstellung der Versuchsergebnisse findet sich in den folgenden Tabellen: Tab. 7 (Seite 48) 70% und 80% Ethanol, Tab. 8 (Seite 54) 30% und 70% Isopropanol. Toxische Veränderungen lagen bei allen Versuchen bis zu einer Virusverdünnungsstufe von 10^{-2} vor.

4.3.1 Ethanol 70%

Den Verlauf der Virustiter unter Einwirkung von 70% Ethanol ohne und mit Belastung zeigen die Abb. 23-25.

- Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab

Die ohne Belastungslösung durchgeführten Versuche ergaben Kontrolltiter zwischen $8,20 \pm 0,00$ und $8,70 \pm 0,38$ (mVT $8,70 \pm 0,22$) \log_{10} . Nach den Einwirkzeiten von 2 bis 30 min lagen die mRF zwischen $0,37 \pm 0,28$ und $0,70 \pm 0,30$ \log_{10} . Nach Ablauf der Einwirkzeiten von 2, 5, 10 und 30 min wurden mRF von 0 bis $0,90 \pm 0,25$ \log_{10} bei Versuchen unter der Belastungslösung „clean conditions“ erreicht. Die Kontrolltiter lagen zwischen $8,10 \pm 0,26$ und $8,60 \pm 0,36$ (mVT $8,43 \pm 0,19$) \log_{10} . Mit der Belastungslösung „dirty conditions“ ergaben sich RF von 0 bis $0,60 \pm 0,41$ (mRF $0,27 \pm 0,27$) \log_{10} nach 2 min, von $0,50 \pm 0,45$ bis $0,90 \pm 0,26$ \log_{10} (mRF $0,77 \pm 0,25$) nach 5 min, von $0,60 \pm 0,50$ bis $2,40 \pm 0,41$ (mRF $1,53 \pm 0,26$) \log_{10} nach 10 min und von $1,40 \pm 0,48$ bis $2,90 \pm 0,48$ (mRF $1,93 \pm 0,26$) \log_{10} nach 30 min. Die Titer der Viruskontrolle waren zwischen $8,50 \pm 0,32$ und $9,10 \pm 0,26$ (mVT $8,93 \pm 0,25$) \log_{10} bestimmt worden.

- ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk

Ohne Belastungslösung ergaben sich RF nach 2 min von $0,40 \pm 0,50$ bis $1,60 \pm 0,44$ (mRF $0,87 \pm 0,25$) \log_{10} , nach 5 min von $0,90 \pm 0,52$ bis $2,00 \pm 0,00$ (mRF $1,33 \pm 0,25$) \log_{10} , nach 10 min von $4,00 \pm 0,54$ bis $\geq 5,00$ (mRF $\geq 4,37$) \log_{10} und nach 30 min von $4,60 \pm 0,46$ bis $\geq 5,00$ (mRF $\geq 4,90$) \log_{10} . Die Titer der Viruskontrollen lagen zwischen $8,20 \pm 0,00$ und $8,70 \pm 0,38$ (mVT $8,50 \pm 0,17$) \log_{10} . Das Resultat aus den Versuchen unter der Belastungslösung „clean conditions“ waren RF von $0,10 \pm 0,48$ bis 1,0 (mRF $0,37 \pm 0,22$) \log_{10} nach 2 min Einwirkung des DM. Nach 5minütiger Einwirkdauer ergaben sich RF von $0,80 \pm 0,51$ bis $3,60 \pm 0,36$ (mRF $1,53 \pm 0,27$) \log_{10} und nach 10 min von $0,00 \pm 0,51$ bis

3,40±0,36 (mRF 3,50±0,26) log₁₀. Titerreduktionen zwischen 4,00±0,51 und 4,70±0,32 (mRF 4,30±0,26) log₁₀ wurden nach 30 min erreicht. Bei diesen Versuchen wurden die Titer der Viruskontrolle zwischen 8,20±0,0 bis 8,80±0,36 (mVT 8,53±0,17) log₁₀ registriert. Mit der Eiweißbelastung „dirty conditions“ lagen nach Ablauf von 2 min Titerreduktionen von 0,00±0,37 bis 2,10±0,52 (mRF 0,80±0,26) log₁₀, nach 5 min von 0,50±0,48 bis 2,60±0,50 (mRF 1,37±0,26) log₁₀, nach 10 min von 1,60±0,46 bis 3,70±0,50 (mRF 2,77±0,26) log₁₀ und nach 30 min von 1,60±0,46 bis 3,60±0,46 (mRF 2,80±0,26) log₁₀ vor. Die Kontrolltiter nahmen Werte von 8,30±0,26 bis 8,70±0,38 (mVT 8,43±0,19) log₁₀ an.

- Statistische Analyse

Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich aus den Versuchen mit 70% Ethanol und PMV und EV als Testviren bei einer Einwirkzeit von 5, 10 und 30 min ohne Belastung sowie bei 10 und 30 min unter der Belastung „clean conditions“.

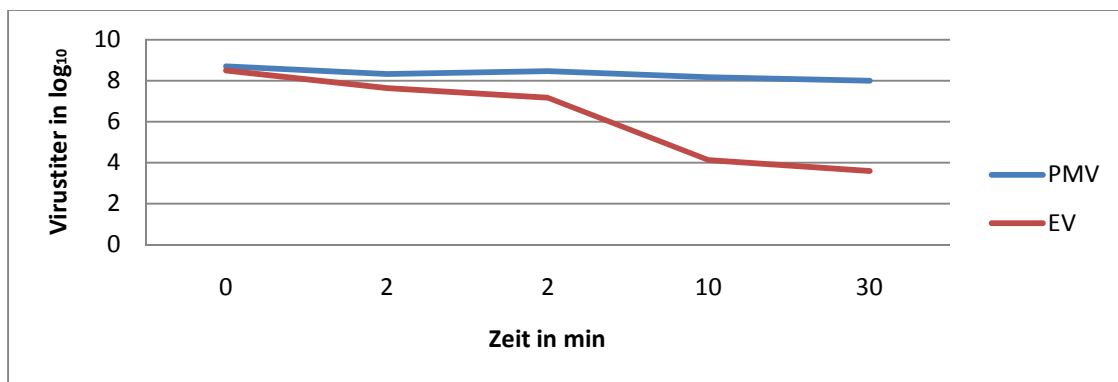


Abb. 23: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 70% Ethanol ohne Eiweißbelastung

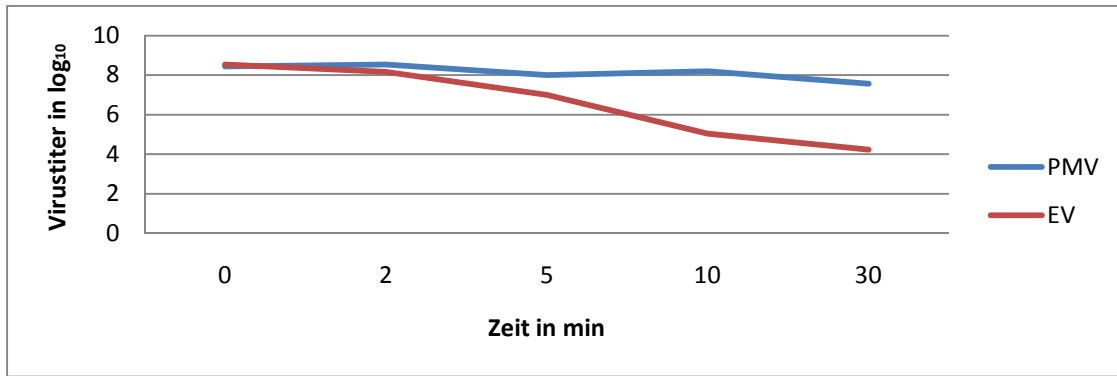


Abb. 24: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 70% Ethanol unter „clean conditions“

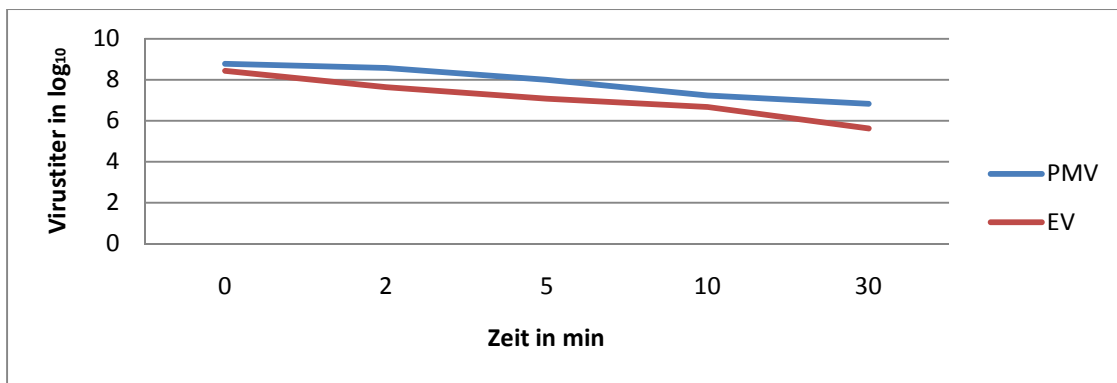


Abb. 25: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 70% Ethanol unter „dirty conditions“

4.3.2 Ethanol 80%

Den Verlauf der Virustiter unter Einwirkung von 80% Ethanol ohne und mit Belastung zeigen die Abb. 26-28.

- *Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab*

Für die Versuche ohne Belastungslösung wurden Virussuspensionen mit Titern von $8,50 \pm 0,32$ bis $8,80 \pm 0,36$ (mVT $8,63 \pm 0,20$) \log_{10} verwendet. Nach 2 und 5 min konnten mRF von $0,47 \pm 0,28$ und $1,07 \pm 0,28$ \log_{10} erzielt werden. Titerreduktionen von $1,40 \pm 0,41$ bis $4,20 \pm 0,51$ (mRF $2,47 \pm 0,28$) \log_{10} wurden für 10 min sowie Werte von $1,30 \pm 0,32$ bis $2,20 \pm 0,48$ (mRF $1,80 \pm 0,26$) \log_{10} für 30 min berechnet. Bei den Versuchen mit der Belastungslösung „clean conditions“ waren die mRF für die Einwirkungszeiten von 2,

5, 10 und 30 min $0,63 \pm 0,24$, $0,70 \pm 0,28$, $0,80 \pm 0,28$ und $1,13 \pm 0,26$ \log_{10} . Die Kontrolltiter lagen zwischen $8,50 \pm 0,32$ und $8,80 \pm 0,36$ (mVT $8,63 \pm 0,20$) \log_{10} . Aus den Einzelversuchen mit „dirty conditions“ ergaben sich nach den Einwirkzeiten von 2, 5, 10 und 30 min mRF von $0,17 \pm 0,25$, $0,47 \pm 0,28$, $0,80 \pm 0,24$ und $1,17 \pm 0,26$) \log_{10} . Die Titer der Viruskontrolle lagen zwischen $8,30 \pm 0,26$ und $8,80 \pm 0,36$ (mVT $8,53 \pm 0,18$) \log_{10} .

- *ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk*

In den durchgeführten Versuchen ohne Belastung lagen die Titer der Viruskontrolle zwischen $8,30 \pm 0,26$ bis $8,60 \pm 0,36$ (mVT $8,47 \pm 0,18$) \log_{10} . Nach 2 min Einwirkdauer ergaben sich RF von $1,50 \pm 0,44$ bis $3,30 \pm 0,44$ (mRF $2,20 \pm 0,27$) \log_{10} . Die RF nach 5 min lagen zwischen $3,60 \pm 0,46$ und $4,20 \pm 0,41$ (mRF $3,90 \pm 0,27$) \log_{10} , nach 10 min bei $3,60 \pm 0,46$ bis $4,40 \pm 0,44$ (mRF $4,07 \pm 0,25$) \log_{10} und nach 30 min bei $3,90 \pm 0,52$ bis $4,50 \pm 0,45$ (mRF $4,23 \pm 0,27$) \log_{10} . Aus Versuchen unter der Eiweißbelastung „clean conditions“ resultierten nach 2 min RF von $0,50 \pm 0,41$ bis $1,00 \pm 0,54$ (mRF $0,83 \pm 0,26$) \log_{10} , nach 5 min RF von $1,90 \pm 0,48$ bis $3,10 \pm 0,52$ (mRF $2,67 \pm 0,28$) \log_{10} , nach 10 min RF von $4,00 \pm 0,45$ bis $4,20 \pm 0,41$ (mRF $4,10 \pm 0,24$) \log_{10} und nach 30 min RF von $\geq 4,30$ bis $5,10 \pm 0,52$ (mRF $\geq 4,57$) \log_{10} . Für die Titer der Viruskontrolle ergaben sich Werte von $7,50 \pm 0,32$ bis $8,70 \pm 0,38$ (mVT $7,90 \pm 0,20$) \log_{10} . Bei Versuchen unter „dirty conditions“ waren nach 2 min RF von $0,00 \pm 0,45$ bis $2,30 \pm 0,44$ (mRF $0,77 \pm 0,27$) \log_{10} , nach 5 min von $1,90 \pm 0,52$ bis $3,40 \pm 0,46$ (mRF $2,73 \pm 0,28$) \log_{10} , nach 10 min RF von $3,30 \pm 0,44$ bis $4,30 \pm 0,48$ (mRF $3,83 \pm 0,27$) \log_{10} und nach 30 min RF von $\geq 4,30$ und $5,80 \pm 0,44$ (mRF $\geq 4,83$) \log_{10} zu verzeichnen. Die Viruskontrolltiter lagen zwischen $7,50 \pm 0,32$ und $9,10 \pm 0,26$ (mVT $8,07 \pm 0,18$) \log_{10} .

- Statistische Analyse

Statistisch signifikante Unterschiede bei den Versuchen mit 80% Ethanol sowie dem PMV und EV als Testviren ergaben sich nach 5 und 30 min ohne Belastung sowie nach 5, 10 und 30 min mit der Belastung „clean“ und „dirty conditions“.

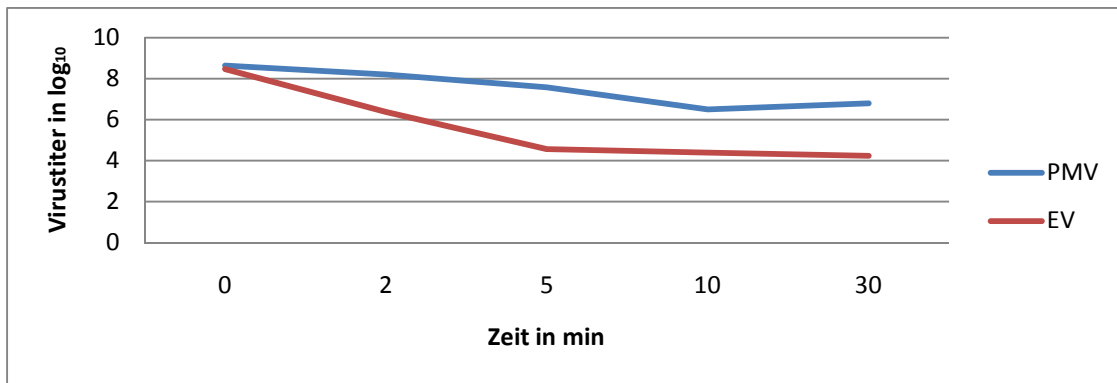


Abb. 26: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 80% Ethanol ohne Eiweißbelastung

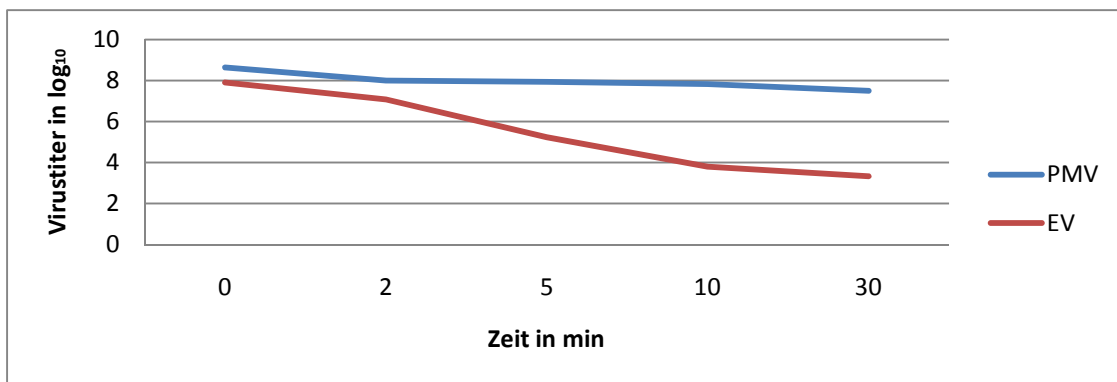


Abb. 27: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 80% Ethanol unter „clean conditions“

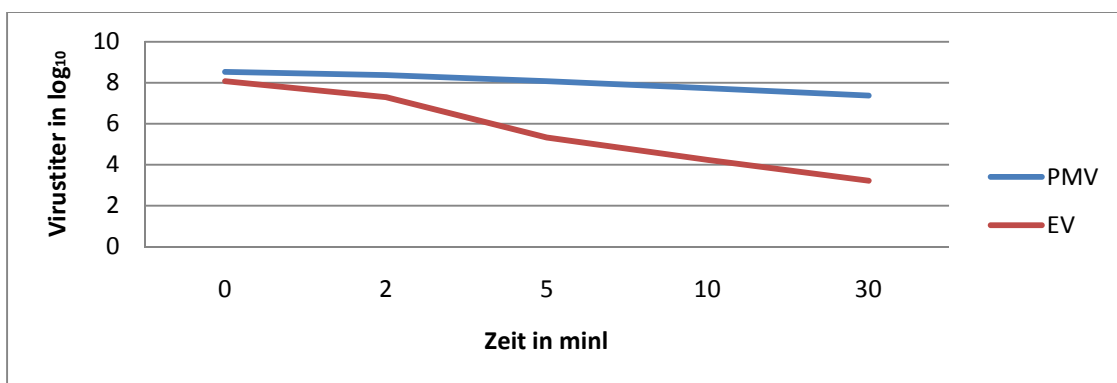


Abb. 28: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 80% Ethanol unter „dirty conditons“

Tab. 7. Zusammenfassende Darstellung der viruziden Wirksamkeit von Ethanol gegenüber Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk. Daten basieren auf dem arithmetischen Mittel aus 3 unabhängigen Einzelversuchen

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkdauer (min)	Viruskontrolle (log ₁₀) und Reduktionsfaktor in log ₁₀ (fett)						Statistische Signifikanz (p-value) n.s. = nicht Signifikant		
			Poliovirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab			ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk					
			A. bidest.	Clean conditions	Dirty conditions	A. bidest.	Clean conditions	Dirty conditions	A .bidest.	Clean conditions	Dirty conditions
Ethanol	70	2	8,70±0,22 0,37±0,28	8,43±0,19 0,03±0,27	8,93±0,25 0,27±0,27	8,50±0,17 0,87±0,25	8,53±0,17 0,37±0,22	8,43±0,19 0,80±0,26	n.s.	n.s.	n.s.
		5	8,70±0,22 0,23±0,27	8,43±0,19 0,43±0,26	8,93±0,25 0,77±0,25	8,50±0,17 1,33±0,25	8,53±0,17 1,53±0,27	8,43±0,19 1,37±0,26	0,040	n.s.	n.s.
		10	8,70±0,22 0,53±0,26	8,43±0,19 0,23±0,25	8,93±0,25 1,53±0,26	8,50±0,17 ≥4,37	8,53±0,17 3,50±0,26	8,43±0,19 2,77±0,26	0,004	<0,001	n.s.
		30	8,70±0,22 0,70±0,30	8,43±0,19 0,90±0,25	8,93±0,25 1,93±0,26	8,50±0,17 ≥4,90	8,53±0,17 4,30±0,26	8,43±0,19 2,80±0,26	<0,001	0,004	n.s.
	80	2	8,63±0,20 0,47±0,28	8,63±0,20 0,63±0,24	8,53±0,18 0,17±0,25	8,47±0,18 2,20±0,27	7,90±0,20 0,83±0,26	8,07±0,18 0,77±0,27	n.s.	n.s.	n.s.
		5	8,63±0,20 1,07±0,28	8,63±0,20 0,70±0,28	8,53±0,18 0,47±0,28	8,47±0,18 3,90±0,27	7,90±0,20 2,67±0,28	8,07±0,18 2,73±0,28	<0,001	0,016	0,032
		10	8,63±0,20 2,47±0,28	8,63±0,20 0,80±0,28	8,53±0,18 0,80±0,24	8,47±0,18 4,07±0,25	7,90±0,20 4,10±0,24	8,07±0,18 3,83±0,27	n.s.	<0,001	0,001
		30	8,63±0,20 1,80±0,26	8,63±0,20 1,13±0,26	8,53±0,18 1,17±0,26	8,47±0,18 4,23±0,27	7,90±0,20 ≥4,57	8,07±0,18 ≥4,83	0,002	0,003	0,017

4.3.3 Isopropanol 30 %

Den Verlauf der Virustiter unter Einwirkung von 30% Isopropanol ohne und mit Belastung zeigen die Abb. 29-31.

- Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab

Die Kontrolltiter bei Versuchen ohne Belastung waren zwischen $8,2 \pm 0,00$ und $8,60 \pm 0,36$ (mVT $8,53 \pm 0,20$) \log_{10} sowie zwischen $8,50 \pm 0,32$ und $9,3 \pm 0,26$ (mVT $8,93 \pm 0,25$) \log_{10} . Die mRF lagen für Einwirkzeiten von 2 bis 30 min bei $0,03 \pm 0,28$, $0,17 \pm 0,27$, $0,20 \pm 0,27$ und $0,50 \pm 0,28$ \log_{10} . Ähnliche Ergebnisse lagen bei den Versuchen mit „clean conditions“ vor. Hier wurden Kontrolltiter von $8,20 \pm 0,00$ bis $8,60 \pm 0,36$ (mVT $8,47 \pm 0,17$) \log_{10} bestimmt. Die mRF nach 2, 5, 10 und 30 min waren $0,06 \pm 0,25$, $0,27 \pm 0,21$, $0,13 \pm 0,25$ und $0,73 \pm 0,26$ \log_{10} . Unter der Belastungslösung „dirty conditions“ ergaben sich Kontrolltiter von $8,50 \pm 0,32$ bis $8,80 \pm 0,36$ (mVT $8,67 \pm 0,20$) \log_{10} mit mRF nach 2, 5, 10 und 30 min von $0,27 \pm 0,25$, $0,37 \pm 0,29$, $0,50 \pm 0,28$ und $0,53 \pm 0,28$ \log_{10} .

- ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk

Nach Kontrolltitern von $8,20 \pm 0,00$ bis $8,50 \pm 0,32$ (mVT $8,33 \pm 0,14$) \log_{10} wurden mRF von $0,43 \pm 0,25$, $0,60 \pm 0,24$, $0,43 \pm 0,21$ und $0,83 \pm 0,26$) \log_{10} für die Einwirkzeiten von 2, 5, 10 und 30 min in den Einzelversuchen ohne Belastungsansatz erreicht. Die unter „clean conditions“ bestimmten Kontrolltiter erreichten Werte von $8,10 \pm 0,26$ bis $8,30 \pm 0,26$ (mVT $8,20 \pm 0,17$) \log_{10} . Für die Einwirkzeiten 2, 5, 10 und 30 min ergaben sich mRF von $0,03 \pm 0,24$, $0,00 \pm 0,26$, $0,33 \pm 0,26$ und $0,47 \pm 0,27$ \log_{10} . Der Befund aus den Versuchen mit „dirty conditions“ ergab Kontrolltiter von $8,20 \pm 0,00$ bis $8,60 \pm 0,36$ (mVT $8,37 \pm 0,15$) \log_{10} . Die mRF blieben mit $0,13 \pm 0,21$, $0,33 \pm 0,24$, $0,67 \pm 0,22$ sowie $1,03 \pm 0,26$ \log_{10} nach 2, 5, 10 und 30 min ebenfalls im niedrigen Bereich.

- Statistische Analyse

Signifikante Unterschiede zwischen PMV und EV bei 30% Isopropanol konnten nur nach 30 min Einwirkung ohne Belastungslösung festgestellt werden.

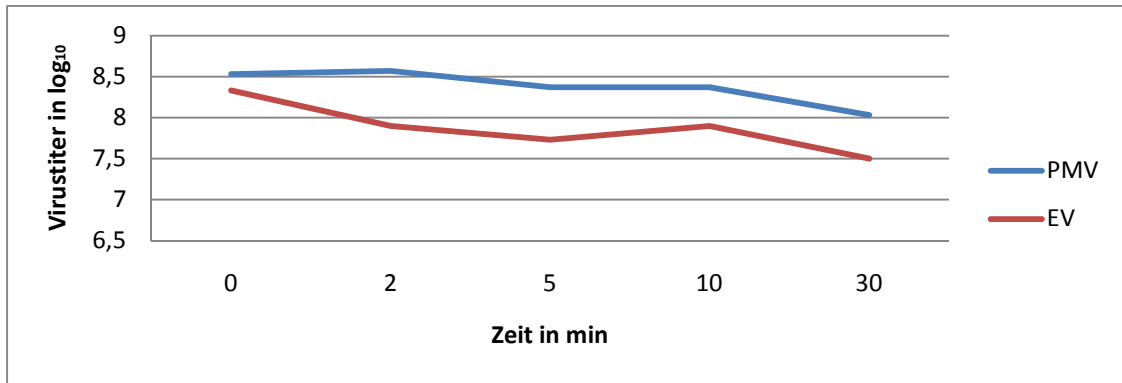


Abb. 29: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 30% Isopropanol ohne Eiweißbelastung

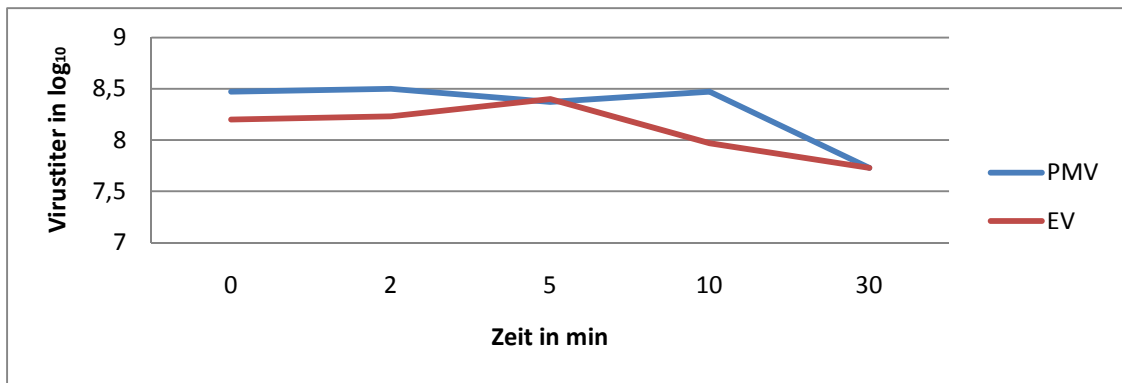


Abb. 30: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 30% Isopropanol unter „clean conditions“

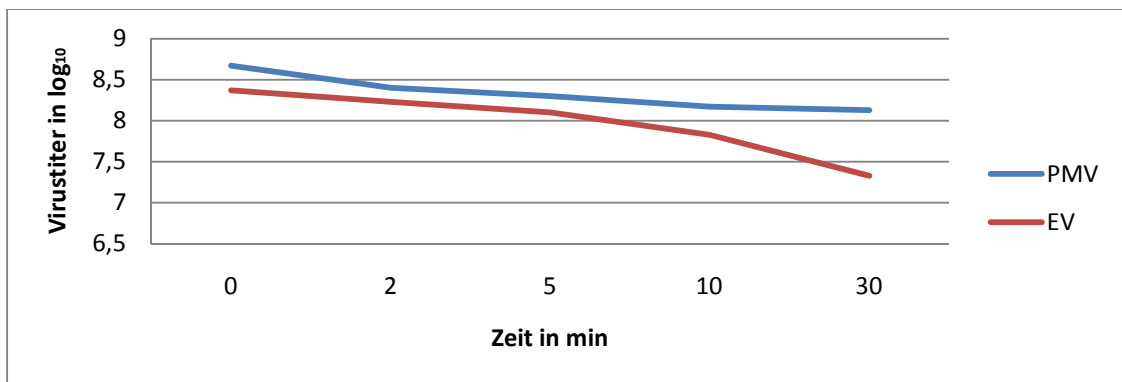


Abb. 31: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 30% Isopropanol unter „dirty conditions“

4.3.4 Isopropanol 70%

Den Verlauf der Virustiter unter Einwirkung von 70% Isopropanol ohne und mit Belastung zeigen die Abb. 32-34.

- Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab

Die Einzelversuche ergaben nach 2, 5, 10 und 30 min mRF von $0,40 \pm 0,23$, $0,67 \pm 0,26$, $0,90 \pm 0,30$ sowie $2,00 \pm 0,28 \log_{10}$. Die verwendeten Virussuspensionen hatten Titer von $8,70 \pm 0,38$ bis $9,00 \pm 0,32$ (mVT $8,83 \pm 0,20$) \log_{10} . Ebenfalls niedrige mRF von $0,0 \pm 0,25$, $0,20 \pm 0,24$, $0,90 \pm 0,25$ und $1,03 \pm 0,23 \log_{10}$ ergaben sich unter der Belastung „clean conditions“ mit den Einwirkzeiten von 2, 5, 10 und 30 min. Die Viruskontrolle hatte Titer von $8,20 \pm 0,00$ bis $8,80 \pm 0,36$ (mVT $8,43 \pm 0,15$) \log_{10} . Aus den Versuchen mit der Belastung „dirty conditions“ wurden nach 2 min RF von $0,50 \pm 0,38$ bis $1,10 \pm 0,52$ (mRF $0,70 \pm 0,28$) \log_{10} , nach 5 min RF von $0,60 \pm 0,57$ bis $1,50 \pm 0,44$ (mRF $1,00 \pm 0,30$) \log_{10} , nach 10 min RF von $1,00 \pm 0,54$ bis $1,90 \pm 0,52$ (mRF $1,37 \pm 0,30$) \log_{10} und nach 30 min RF von $1,40 \pm 0,46$ bis $2,30 \pm 0,48$ (mRF $1,90 \pm 0,27$) \log_{10} bei zugrunde liegenden Kontrolltitern von $8,70 \pm 0,38$ bis $8,80 \pm 0,36$ (mRF $8,73 \pm 0,22$) \log_{10} bestimmt.

- ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk

Ohne Belastungsansatz ergaben sich RF von $0,30 \pm 0,55$ bis $1,40 \pm 0,46$ (mRF $0,80 \pm 0,30$) \log_{10} nach 2 min. Nach 5 min lagen die RF zwischen $0,40 \pm 0,36$ und $1,60 \pm 0,46$ (mRF $0,87 \pm 0,27$) \log_{10} , nach 10 min zwischen $0,90 \pm 0,52$ und $2,10 \pm 0,52$ (mRF $1,53 \pm 0,31$) \log_{10} und nach 60 min zwischen $1,70 \pm 0,63$ und $2,40 \pm 0,46$ (mRF $2,00 \pm 0,31$) \log_{10} . Die Titer der Viruskontrolle lagen bei $8,30 \pm 0,42$ bis $8,70 \pm 0,38$ (mVT $8,53 \pm 0,22$) \log_{10} . Unter Verwendung der Belastungslösung „clean conditions“ wurden nach 2, 5, 10 und 30 min mRF $0,0 \pm 0,26$, $0,10 \pm 0,25$, $1,00 \pm 0,23$ und $1,03 \pm 0,26 \log_{10}$ bei Kontrolltitern von $7,30 \pm 0,26$ bis $8,50 \pm 0,32$ (mVT $8,10 \pm 0,17$) \log_{10} bestimmt. Versuche unter „dirty conditions“ ergaben Kontrolltiter von $7,70 \pm 0,38$ bis $8,70 \pm 0,38$ (mVT $8,23 \pm 0,20$) \log_{10} . Nach 2 min resultierten RF von 0 bis $1,00 \pm 0,54$ (mRF $0,40 \pm 0,28$) \log_{10} , nach 5 min von $0,10 \pm 0,44$ bis $1,40 \pm 0,46$ (mRF $0,53 \pm 0,28$) \log_{10} , nach 10 min von $1,10 \pm 0,50$ bis $2,70 \pm 0,57$ (mRF $1,67 \pm 0,28$) \log_{10} und nach 30 min von $1,60 \pm 0,46$ bis $2,10 \pm 0,52$ (mRF $1,90 \pm 0,29$) \log_{10} .

- Statistische Analyse

Statistisch signifikante Unterschiede von PMV und EV in der Sensitivität gegenüber 70%igem Isopropanol konnten nicht festgestellt werden.

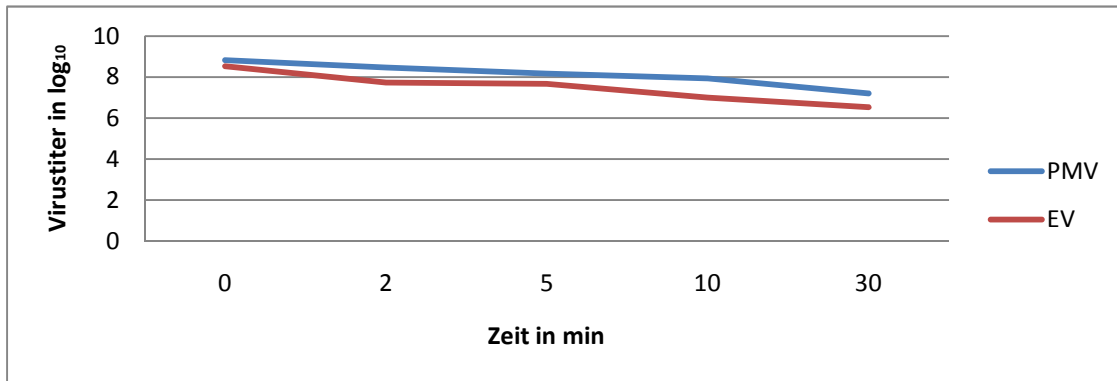


Abb. 32: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 70% Isopropanol ohne Eiweißbelastung

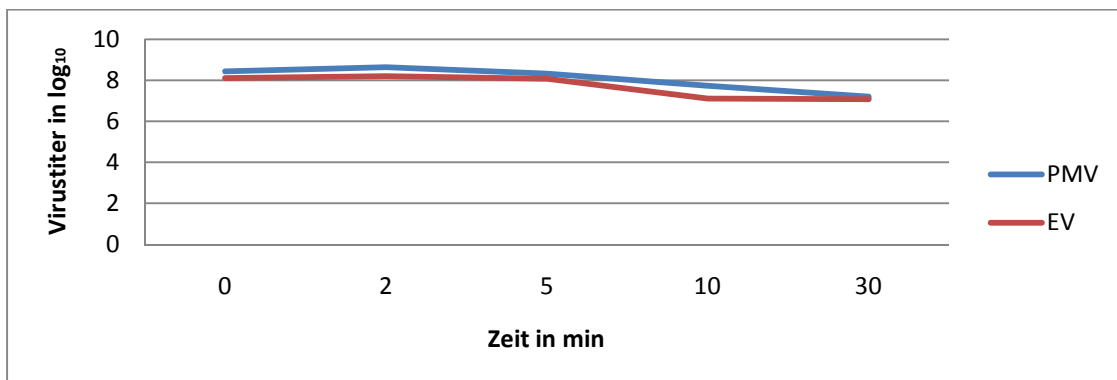


Abb. 33: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 70% Isopropanol unter „clean conditions“

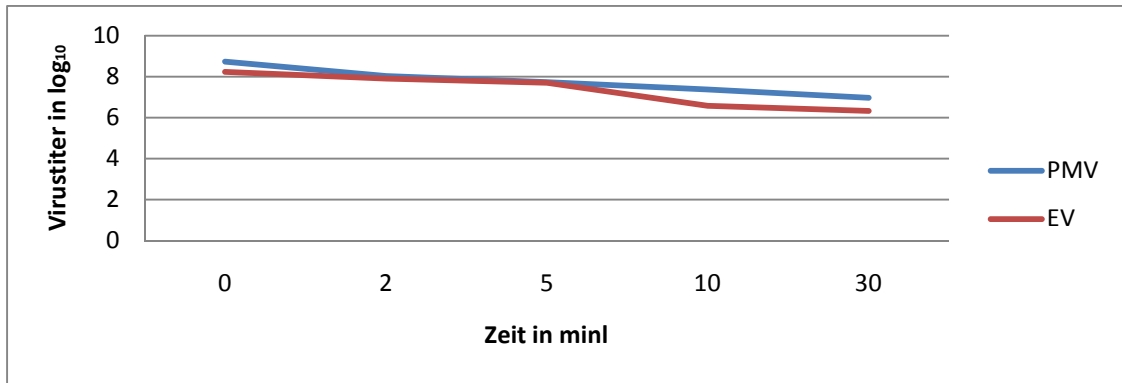


Abb. 34: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 70% Isopropanol unter „dirty conditions“

Tab. 8. Zusammenfassende Darstellung der viruziden Wirksamkeit von Isopropanol gegenüber Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk. Daten basieren auf dem arithmetischen Mittel aus 3 unabhängigen Einzelversuchen

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkdauer (min)	Viruskontrolle (log ₁₀) und Reduktionsfaktor in log ₁₀ (fett)						Statistische Signifikanz (p-value) n.s. = nicht signifikant		
			Poliovirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab			ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk					
			A. bidest.	Clean conditions	Dirty conditions	A. bidest.	Clean conditions	Dirty conditions	A.bidest.	Clean conditions	Dirty conditions
Isopropanol	30	2	8,53±0,20 0,03±0,28	8,47±0,17 0,06±0,25	8,67±0,20 0,27±0,25	8,33±0,14 0,43±0,25	8,20±0,17 0,03±0,24	8,37±0,15 0,13±0,21	0,006	n.s.	n.s.
		5	8,93±0,25 0,17±0,27	8,47±0,17 0,27±0,21	8,67±0,20 0,37±0,29	8,33±0,14 0,60±0,24	8,20±0,17 0,00±0,26	8,37±0,15 0,33±0,24	n.s.	n.s.	n.s.
		10	8,93±0,25 0,20±0,27	8,47±0,17 0,13±0,25	8,67±0,20 0,50±0,28	8,33±0,14 0,43±0,21	8,20±0,17 0,33±0,26	8,37±0,15 0,67±0,22	n.s.	n.s.	n.s.
		30	8,93±0,25 0,50±0,28	8,47±0,17 0,73±0,26	8,67±0,20 0,53±0,28	8,33±0,14 0,83±0,26	8,20±0,17 0,47±0,27	8,37±0,15 1,03±0,26	n.s.	n.s.	n.s.
	70	2	8,83±0,20 0,40±0,23	8,43±0,15 0,00±0,25	8,73±0,22 0,70±0,28	8,53±0,22 0,80±0,30	8,10±0,17 0,00±0,26	8,23±0,20 0,40±0,28	n.s.	n.s.	n.s.
		5	8,83±0,25 0,67±0,26	8,43±0,15 0,20±0,24	8,73±0,22 1,00±0,30	8,53±0,22 0,87±0,27	8,10±0,17 0,10±0,25	8,23±0,20 0,53±0,28	n.s.	n.s.	n.s.
		10	8,83±0,25 0,90±0,30	8,43±0,15 0,90±0,25	8,73±0,22 1,37±0,30	8,53±0,22 1,53±0,31	8,10±0,17 1,00±0,23	8,23±0,20 1,67±0,28	n.s.	n.s.	n.s.
		30	8,83±0,25 2,00±0,28	8,43±0,15 1,03±0,23	8,73±0,22 1,90±0,27	8,53±0,22 2,00±0,31	8,10±0,17 1,03±0,26	8,23±0,20 1,90±0,29	n.s.	n.s.	n.s.

4.4 Peressigsäure

Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zur Testung der PES in den Konzentrationen von 0,05% und 0,5% wird in Tab. 9 (Seite 60) wiedergegeben. Toxische Veränderungen in den Zellkulturen gab es nach Verwendung von PES in den Konzentrationen von 0,05% und 0,5% bei einer Virusverdünnungsstufe von 10^{-2} bis 10^{-3} . Den Verlauf der Virustiter unter Einwirkung von 0,05% PES ohne und mit Belastung zeigen die Abb. 35-37. Den Verlauf der Virustiter unter Einwirkung von 0,5% PES ohne und mit Belastung zeigen die Abb. 38-40.

4.4.1 Peressigsäure 0,05%

- Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab

Für das PMV ergaben sich ohne Eiweißbelastung Kontrolltiter von 8,20 bis 8,80±0,36 (mVT 8,53±0,17) \log_{10} . Die RF lagen nach 2 min zwischen 0,20±0,32 und 0,30±0,57 (mRF 0,23±0,28) \log_{10} . Nach 5 min waren die RF zwischen 0,60±0,36 bis 1,0±0,38 (mRF 0,83±0,26) \log_{10} , nach 10 min zwischen 1,30±0,48 und 1,50±0,57 (mRF 1,40±0,28) \log_{10} sowie nach 30 min im Intervall von 2,20±0,32 bis 2,70±0,44 (mRF 2,40±0,26) \log_{10} . Mit der Eiweißbelastung „clean conditions“ wurden Kontrolltiter von 9,50±0,32 bis 9,70±0,38 (mVT 9,60±0,21) \log_{10} erzielt. Zwei Minuten nach Versuchsbeginn lagen die RF zwischen 0 und 1,0±0,54 (mRF 0,63±0,29) \log_{10} , nach 5 min von 1,01±0,48 bis 1,40±0,46 (mRF 1,23±0,28) \log_{10} , nach 10 min bei 2,10±0,52 bis 2,40±0,36 (mRF 2,27±0,24) \log_{10} und nach 30 min bei 2,60±0,48 bis 2,90±0,52 (mRF 2,80±0,26) \log_{10} . Unter der Eiweißbelastung „dirty conditions“ ergaben sich Kontrolltiter von 8,70±0,38 bis 9,00±0,44 (mVT 8,83±0,25) \log_{10} . Nach einer Einwirkzeit von 2 min konnten RF von 0,00±0,54 bis 0,60±0,46 (mRF 0,20±0,32) \log_{10} sowie nach 5 min von 0,50±0,58 bis 1,90±0,52 (mRF 1,07±0,32) \log_{10} bestimmt werden. Eine Einwirkungszeit von 0,05% PES über 10 min bewirkte RF zwischen 1,30±0,56 und 1,80±0,57 (mRF 1,53±0,32) \log_{10} , während nach 30 min RF von 1,70±0,53 bis 2,20±0,57 (mRF 1,93±0,32) \log_{10} vorlagen.

- ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk

Ohne Eiweißbelastung resultierten Kontrolltiter von 8,10±0,42 bis 9,30±0,42 (mVT 8,50±0,24) \log_{10} . Nach 2 min wurden RF zwischen 1,40±0,53 und 3,50±0,49 (mRF

2,23±0,29) \log_{10} berechnet. Bei den restlichen Einwirkzeiten von 5, 10 und 30 min ergaben sich aufgrund der Toxizität Titer von jeweils $\leq 4,20 \log_{10}$. Daraus resultierten RF von jeweils $\geq 4,00$ (mRF $\geq 4,30$) \log_{10} . Unter der Eiweißbelastung „clean conditons“ ergaben sich Vergleichstiter zwischen 8,20±0,36 und 9,20±0,46 (mVT 8,70±0,21) \log_{10} . Nach 2 min Einwirkung lagen die RF zwischen 0 bis 1,40±0,58 (mRF 0,60±0,27) \log_{10} und nach 5 min zwischen 1,20±0,48 bis 2,50±0,64 (mRF 1,63±0,32) \log_{10} . Reduktionsfaktoren von $\geq 4,00$ (mRF $\geq 4,50$) \log_{10} wurden nach 10 und 30 min erreicht. Unter „dirty conditions“ erreichten die Kontrolltiter Werte zwischen 8,30±0,26 und 8,60±0,36 (mVT 8,47±0,18) \log_{10} . Zwei Minuten nach Versuchsbeginn lagen die RF zwischen 0,20±0,37 und 0,60±0,48 (mRF 0,37±0,28) \log_{10} und nach 5 min zwischen 1,00±0,37 und 1,40±0,51 (mRF 1,13±0,26) \log_{10} . Für die restlichen Zeiten von 15 und 30 min wurden aufgrund der Zytotoxizität jeweils RF von $\geq 4,10$ (mRF $\geq 4,27$) \log_{10} bestimmt.

- Statistische Analyse

Statistisch signifikante Unterschiede von PMV und EV unter Verwendung von 0,05% PES ergaben sich nach 5, 10 und 30 min ohne Belastungslösung sowie nach 10 und 30 min unter „clean“ und „dirty conditions“.

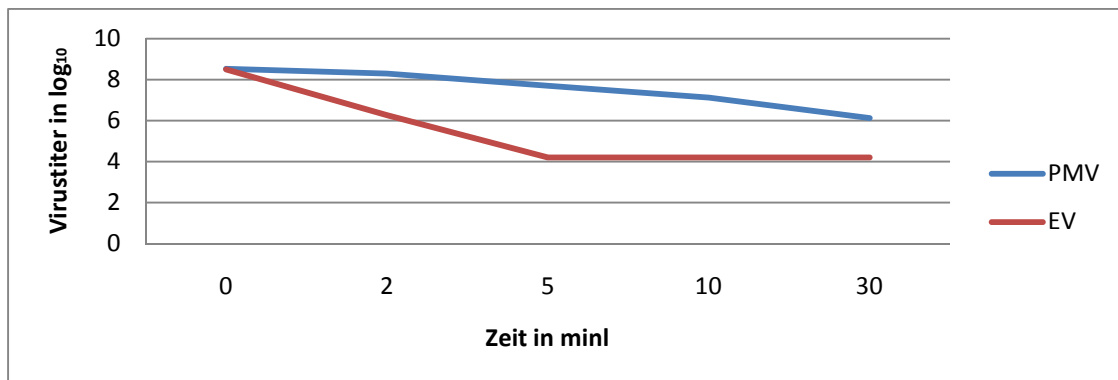


Abb. 35: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Peressigsäure ohne Eiweißbelastung

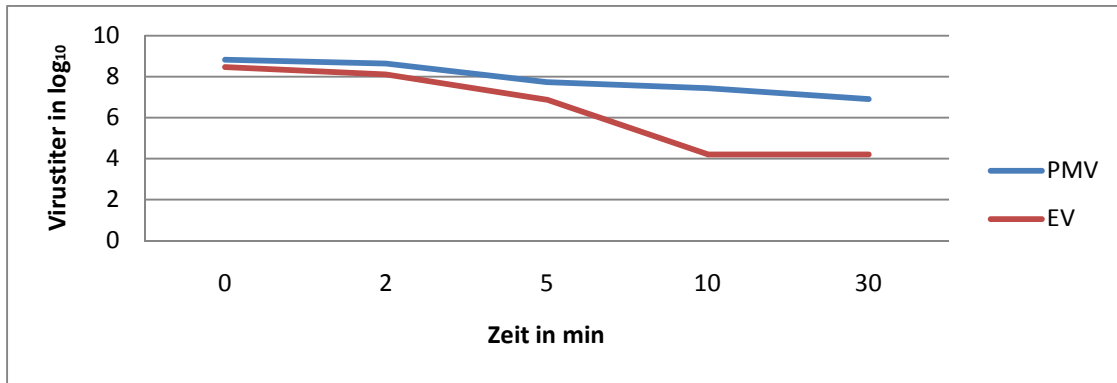


Abb. 36: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Peressigsäure unter „clean conditions“

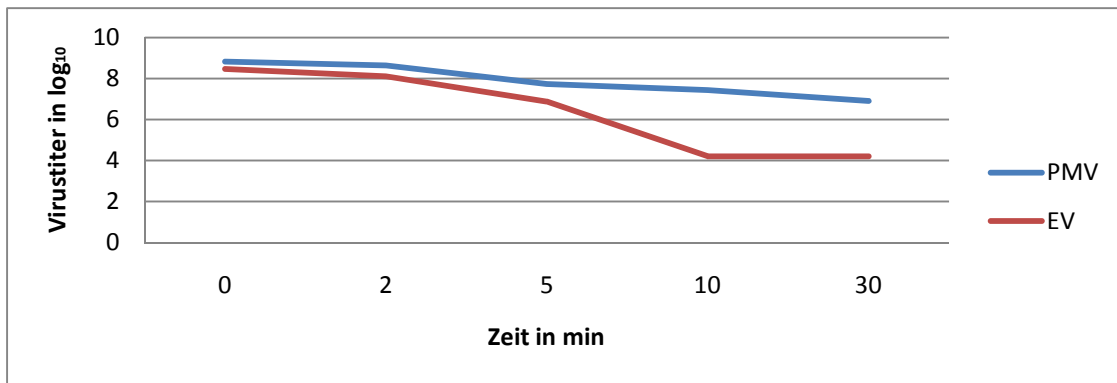


Abb. 37: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Peressigsäure unter „dirty conditions“

4.4.2 Peressigsäure 0,5%

- Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab

In der ersten Versuchsreihe ohne Belastung ergaben sich Kontrolltiter zwischen $8,00 \pm 0,5$ und $9,00 \pm 0,48$ (mVT $8,43 \pm 0,25$) \log_{10} . Bei einer Einwirkdauer von 2 min wurden RF von 0 bis $0,50 \pm 0,44$ (mRF $0,30 \pm 0,33$) \log_{10} errechnet. Für die übrigen Zeiten von 5, 10 und 30 min lagen die Virustiter bei $\leq 4,20 \log_{10}$. Die jeweiligen mRF waren $\geq 4,23 \log_{10}$. Kontrolltiter von $8,20 \pm 0,00$ bis $8,50 \pm 0,3$ (mVT $9,07 \pm 0,23$) \log_{10} ergaben sich aus den Versuchen mit der Eiweißbelastung „clean conditions“. Reduktionsfaktoren von $0,70 \pm 0,56$ bis $1,50 \pm 0,45$ ($1,03 \pm 0,28$) \log_{10} resultierten aus 2 min Einwirkung der Testsubstanz. Reduktionsfaktoren von $\geq 4,00$ (mRF $\geq 4,87$) \log_{10}

wurden nach 5 bis 30 min erreicht. Unter der Eiweißbelastung „dirty conditions“ ergaben sich Kontrolltiter von $8,10 \pm 0,26$ bis $8,70 \pm 0,38$ (mVT $8,33 \pm 0,19$) \log_{10} . Zwei Minuten nach Versuchsbeginn lagen die RF zwischen $0,00 \pm 0,37$ und $1,20 \pm 0,41$ (mRF $0,40 \pm 0,22$) \log_{10} . Auf Grund der Zytotoxizität wurde für die folgenden Zeiten von 5, 10 und 30 min ein jeweiliger Titer von $\leq 4,20 \log_{10}$ angegeben. Die berechneten RF waren alle $\geq 4,00$ (mRF $\geq 4,13$) \log_{10} .

- *ECHO-Virus Typ 1 Stamm IFarouk*

Ohne Eiweißbelastung erfolgte bereits nach 2 min Einwirkdauer eine Titerreduktion bis auf $< 4,00$ (mRF $\geq 4,03$) \log_{10} bei Viruskontrolltitern von $7,70 \pm 0,38 \log_{10}$ bis $8,50 \pm 0,32$ (mVT $8,23 \pm 0,18$) \log_{10} . Mit der Eiweißbelastung „clean conditions“ ergaben sich Kontrolltiter zwischen $7,70 \pm 0,38$ und $8,50 \pm 0,44$ (mVT $8,33 \pm 0,14$) \log_{10} . Für jede Einwirkdauer von 2, 5, 10 und 30 min der Testsubstanz wurden Titer von $\geq 4,20$ bestimmt. Die RF für diese Zeiten lagen zwischen $\geq 3,50 \log_{10}$ und $\geq 4,30$ (mRF $\geq 4,03$) \log_{10} . In den Versuchen mit der Eiweißbelastung „dirty conditions“ konnten Kontrolltiter von $8,60 \pm 0,36$ bis $9,20 \pm 0,36$ (mVT $8,43 \pm 0,19$) \log_{10} berechnet werden. Reduktionsfaktoren zwischen $2,60 \pm 0,37$ und $3,20 \pm 0,62$ (mRF $2,80 \pm 0,24$) \log_{10} lagen nach 2 min Einwirkzeit vor. Für die übrigen Einwirkzeiten von 5, 10 und 30 min wurden jeweils RF von $\geq 4,40$ bis $\geq 5,00$ (mRF $\geq 4,63$) \log_{10} bestimmt.

- Statistische Analyse

Statistisch signifikante Unterschiede der Testviren PMV und EV ergaben sich bei der Verwendung von 0,5% PES nach 2 min ohne und mit den Belastungslösungen sowie nach 10 und 30 min unter „clean conditions“.

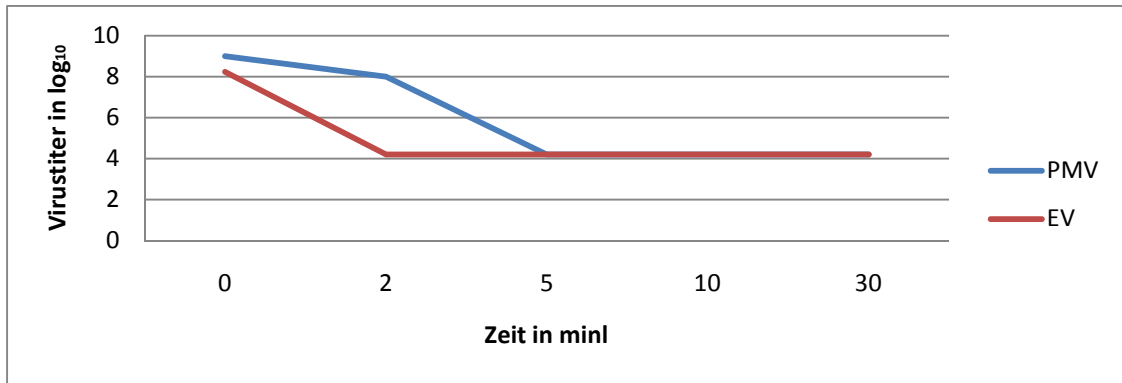


Abb. 38: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,5% Peressigsäure ohne Eiweißbelastung

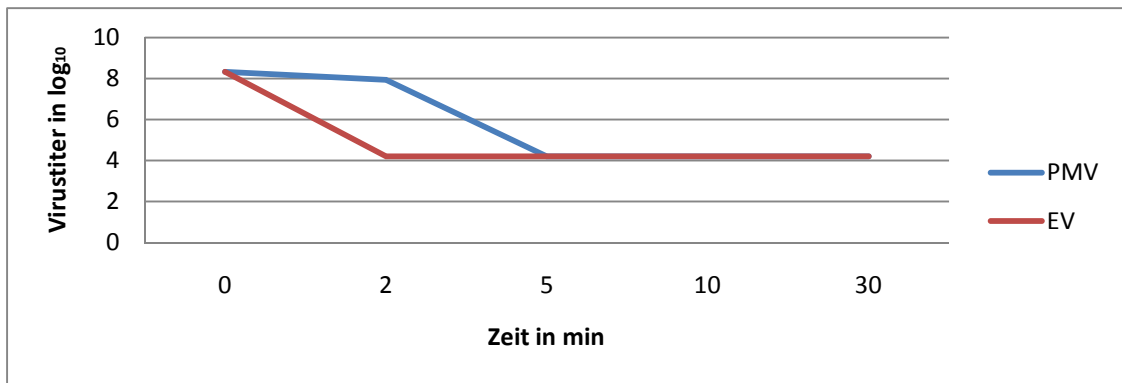


Abb. 39: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,5% Peressigsäure unter „clean conditions“

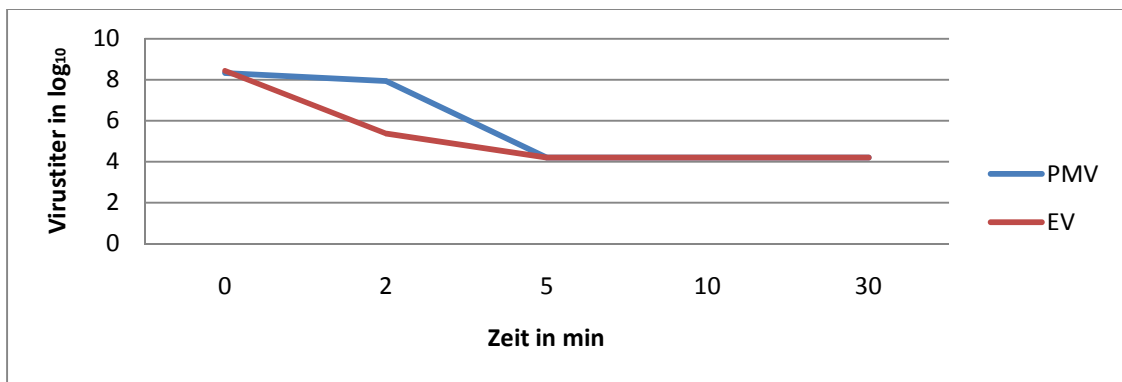


Abb. 40: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,5% Peressigsäure unter „dirty conditions“

Tab. 9. Zusammenfassende Darstellung der viruziden Wirksamkeit von Peressigsäure gegenüber Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk. Daten basieren auf dem arithmetischen Mittel aus 3 unabhängigen Einzelversuchen

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkdauer (min)	Viruskontrolle (log ₁₀) und Reduktionsfaktor in log ₁₀ (fett)						Statistische Signifikanz (p-value) n.s. = nicht signifikant		
			Poliovirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab			ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk					
			A. bidest.	Clean conditions	Dirty conditions	A. bidest.	Clean conditions	Dirty conditions	A. bidest.	Clean conditions	Dirty conditions
Peressigsäure	0,05	2	8,53±0,17 0,23±0,28	9,60±0,21 0,63±0,29	8,83±0,25 0,20±0,32	8,50±0,24 2,23±0,29	8,70±0,21 0,60±0,27	8,47±0,18 0,37±0,28	n.s.	n.s.	n.s.
		5	8,53±0,17 0,83±0,26	9,60±0,21 1,23±0,28	8,83±0,25 1,07±0,32	8,50±0,24 ≥4,30	8,70±0,21 1,63±0,32	8,47±0,18 1,13±0,26	0,008	n.s.	n.s.
		10	8,53±0,17 1,40±0,28	9,60±0,21 2,27±0,24	8,83±0,25 1,53±0,32	8,50±0,24 ≥4,30	8,70±0,21 ≥4,50	8,47±0,18 ≥4,27	0,017	0,002	<0,001
		30	8,53±0,17 2,40±0,26	9,60±0,21 2,80±0,26	8,83±0,25 1,93±0,32	8,50±0,24 ≥4,30	8,70±0,21 ≥4,50	8,47±0,18 ≥4,27	0,011	0,005	<0,001
	0,5	2	8,43±0,25 0,30±0,33	9,07±0,23 1,03±0,28	8,33±0,19 0,40±0,22	8,23±0,18 ≥4,03	8,33±0,14 ≥4,03	8,43±0,19 2,80±0,24	<0,001	0,001	0,006
		5	8,43±0,25 ≥4,23	9,07±0,23 ≥4,87	8,33±0,19 ≥4,13	8,23±0,18 ≥4,03	8,33±0,14 ≥4,03	8,43±0,19 ≥4,63	n.s.	n.s.	n.s.
		10	8,43±0,25 ≥4,23	9,07±0,23 ≥4,87	8,33±0,19 ≥4,13	8,23±0,18 ≥4,03	8,33±0,14 ≥4,03	8,43±0,19 ≥4,63	n.s.	0,039	n.s.
		30	8,43±0,25 ≥4,23	9,07±0,23 ≥4,87	8,33±0,19 ≥4,13	8,23±0,18 ≥4,03	8,33±0,14 ≥4,03	8,43±0,19 ≥4,63	n.s.	0,039	n.s.

4.5 Povidon-Jod

Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus den Versuchen mit 0,05% PVP-Jod, mit 0,125% PVP-Jod und mit 0,5% PVP-Jod wird in Tab. 10 (Seite 69) gezeigt. Toxische Veränderungen lagen bis zu einer Virusverdünnungsstufe von 10^{-2} in allen Versuchen gegenüber 0,05%, 0,125% und 0,5% PVP-Jod vor.

4.4.1 Povidon-Iod 0,05%

Den Verlauf der Virustiter unter Einwirkung von 0,05% PVP-Jod ohne und mit Belastung zeigen die Abb. 41-43.

- Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab

Aus durchgeführten Versuchen ohne Belastungslösung ergaben sich Viruskontrolltiter zwischen $8,30 \pm 0,26$, und $8,60 \pm 0,36$ (mVT $8,47 \pm 0,18$) \log_{10} . Zwei Minuten nach Versuchsbeginn waren Titerreduktionen von 0 bis $0,50 \pm 0,45$ (mRF $0,30 \pm 0,24$) \log_{10} zu registrieren. Nach 5 min Einwirkdauer wurden RF von $0,10 \pm 0,26$ bis $1,90 \pm 0,52$ (mRF $1,27 \pm 0,26$) \log_{10} , nach 10 min lagen die RF zwischen $0,10 \pm 0,26$ bis $2,50 \pm 0,44$ (mRF $1,53 \pm 0,24$) \log_{10} und nach 1 h wurden RF zwischen $2,50 \pm 0,44$ und $3,00 \pm 0,45$ (mRF $2,77 \pm 0,27$) \log_{10} berechnet. Mit der Belastung „clean conditions“ ergaben sich Kontrolltiter von $8,10 \pm 0,26$ bis $8,80 \pm 0,36$ (mVT $8,37 \pm 0,19$) \log_{10} . Nach 2 min wurden Titerreduktionen von 0 bis $0,20 \pm 0,51$ (mRF $0,06 \pm 0,26$) \log_{10} ermittelt. Reduktionsfaktoren von 0 bis $0,70 \pm 0,44$ (mRF $0,23 \pm 0,23$) \log_{10} resultierten nach 5 min Einwirkung des Antiseptikums. Nach 10 min lagen die RF zwischen 0 und $1,30 \pm 0,44$ (mRF $0,57 \pm 0,23$) \log_{10} . Reduktionsfaktoren von $0,50 \pm 0,44$ bis $1,30 \pm 0,52$ (mRF $0,97 \pm 0,28$) \log_{10} wurden nach 60 min erzielt. Wurde die Belastungslösung „dirty conditions“ verwendet, ergaben sich nach 2 min RF von $0,20 \pm 0,51$ bis $0,40 \pm 0,51$ (mRF $0,33 \pm 0,28$) \log_{10} , ausgehend von Kontrolltitern mit $8,50 \pm 0,32$ bis $8,80 \pm 0,36$ (mVT $8,63 \pm 0,20$) \log_{10} . Fünf Minuten nach Versuchsstart lagen die RF zwischen $0,60 \pm 0,48$ und $0,80 \pm 0,48$ (mRF $0,70 \pm 0,28$) \log_{10} sowie nach 10 min zwischen $0,10 \pm 0,52$ und $1,40 \pm 0,36$ (mRF $0,80 \pm 0,27$) \log_{10} . Titerreduktionen von $0,50 \pm 0,45$ bis $1,30 \pm 0,48$ (mRF $0,97 \pm 0,27$) \log_{10} waren das Ergebnis aus 60 min Einwirkdauer.

- *ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk*

Aus Versuchen, welche ohne Eiweißbelastung durchgeführt wurden, ergaben sich nach 2 min Einwirkdauer RF von $0,50 \pm 0,52$ bis $2,00 \pm 0,54$ (mRF $1,27 \pm 0,30$) \log_{10} , nach 5 min RF von $0,4 \pm 0,51$ bis $1,9 \pm 0,54$ (mRF $1,17 \pm 0,29$) \log_{10} und nach 10 min RF von $0,60 \pm 0,51$ bis $2,60 \pm 0,46$ (mRF $1,47 \pm 0,28$) \log_{10} . Titerreduktionen von $0,90 \pm 0,44$ bis $4,00 \pm 0,54$ (mRF $2,27 \pm 0,27$) \log_{10} wurden nach 60 min bei Kontrolltitern von $8,00 \pm 0,32$ bis $8,70 \pm 0,38$ (mVT $8,30 \pm 0,20$) \log_{10} bestimmt. Unter der Eiweißbelastung „clean conditions“ ergaben sich Kontrolltiter von $7,50 \pm 0,32$ bis $9,00 \pm 0,32$ (mVT $8,33 \pm 0,18$) \log_{10} . Für die Einwirkzeiten von 2, 5, 10 und 60 min waren die mRF $0,20 \pm 0,26$, $0,23 \pm 0,27$, $1,03 \pm 0,28$ und $1,07 \pm 0,27$) \log_{10} . Mit dem Belastungsansatz „dirty conditions“ waren nach 2, 5, 10 und 60 min mRF von $0,30 \pm 0,25$, $0,53 \pm 0,27$, $0,70 \pm 0,28$ und $0,80 \pm 0,28$ \log_{10} zu registrieren. Die Kontrolltiter wurden mit Werten zwischen $7,80 \pm 0,36$ und $8,70 \pm 0,38$ (mVT $8,27 \pm 0,18$) \log_{10} bestimmt.

- Statistische Analyse

Bei den Versuchen, die mit 0,05% PVP-Jod durchgeführt wurden, ergaben sich zwischen dem PMV und EV keine signifikanten Unterschiede in deren Sensitivität gegenüber dem angewendeten Antiseptikum.

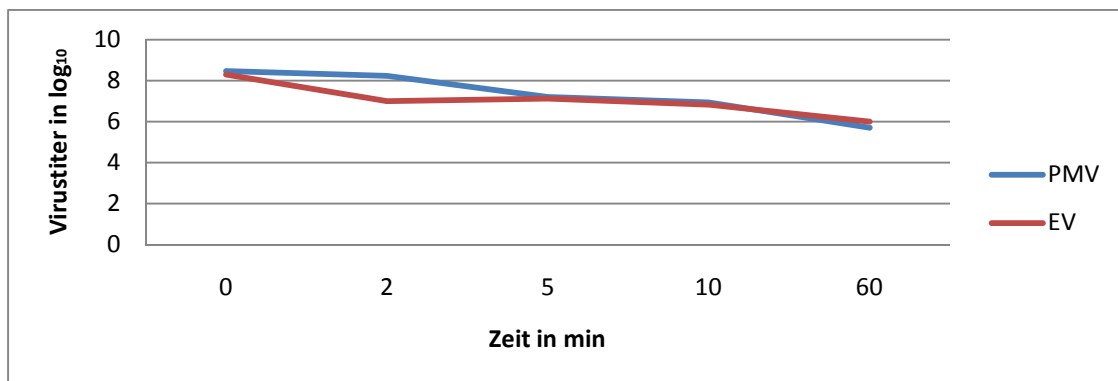


Abb. 41: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Povidon-Jod ohne Eiweißbelastung

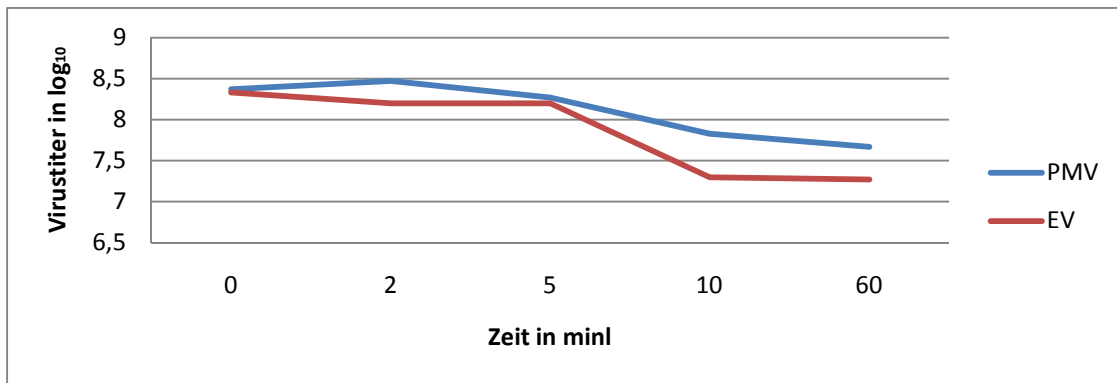


Abb. 42: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Povidon-Jod unter „clean conditions“

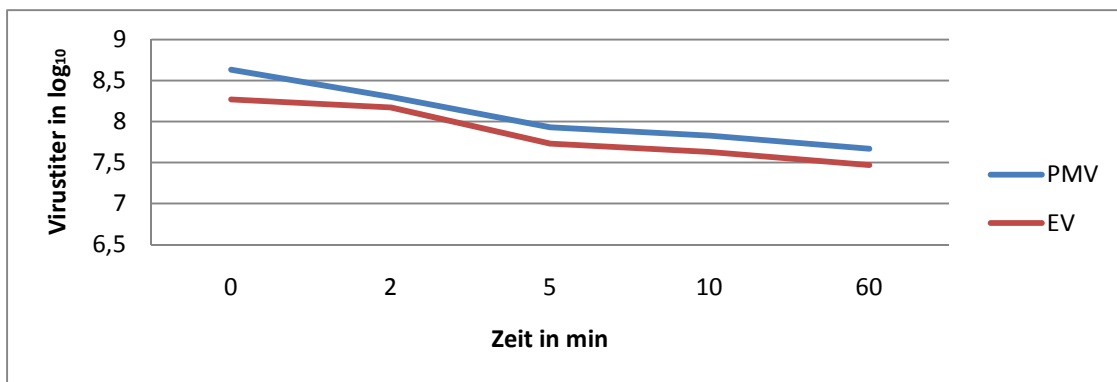


Abb. 43: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Povidon-Jod unter „dirty conditions“

4.5.2 Povidon-Jod 0,125%

Den Verlauf der Virustiter unter Einwirkung von 0,125% PVP-Jod ohne und mit Belastung zeigen die Abb. 44-46.

- Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab

Aus den Einzelversuchen ohne Belastung ergaben sich Kontrolltiter von $8,30 \pm 0,26$ bis $8,80 \pm 0,36$ (mVT $8,47 \pm 0,18$) \log_{10} . Nach 2 min Einwirkdauer resultierten RF von 0 bis $1,00 \pm 0,51$ (mRF $0,40 \pm 0,27$) \log_{10} , nach 5 min von 0 bis $2,50 \pm 0,38$ (mRF $0,77 \pm 0,23$) \log_{10} , nach 10 min von $0,90 \pm 0,48$ bis $1,70 \pm 0,44$ (mRF $1,23 \pm 0,27$) \log_{10} und nach 60 min RF von $0,60 \pm 0,46$ \log_{10} bis $4,10 \pm 0,52$ (mRF $1,77 \pm 0,23$) \log_{10} . Aus den Versuchen unter „clean conditions“ ergaben sich nach 2, 5, 10 und 60 min mRF von $0,50 \pm 0,23$,

0,90±0,23, 0,60±0,22 und 1,00±0,23 log₁₀. Die Viruskontrolle nahm Titer mit Werten von 8,20±0,00 bis 8,8±0,36 (mVT 8,43±0,15) log₁₀ an. Die RF, die bei Versuchen mit der Belastung „dirty conditions“ ermittelt wurden, lagen nach 2 min zwischen 0 und 0,60±0,47 (mRF 0,40±0,27) log₁₀, nach 5 min zwischen 0,30±0,32 und 1,20±0,37 (mRF 0,77±0,23) log₁₀ und nach 10 min zwischen 0,90±0,48 und 1,70±0,44 (mRF 1,23±0,27) log₁₀. Nach 60 min Einwirkdauer waren RF von 1,40±0,41 bis 2,10±0,26 (mRF 1,77±0,23) log₁₀ zu verzeichnen. Die Ergebnisse der Viruskontrolle waren Titer zwischen 8,30±0,26 und 8,60±0,36 (mVT 8,47±0,18) log₁₀.

- *ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk*

Die Auswertung der Ergebnisse aus den Einzelversuchen ohne Belastungslösung ergab Kontrolltiter von 8,10±0,26 bis 8,50±0,32 (mVT 8,27±0,14) log₁₀. Nach 2 min Einwirkdauer konnten RF von 0 bis 0,80±0,37 (mRF 0,27±0,20) log₁₀, nach 5 min von 1,10±0,41 bis 1,70±0,48 (mRF 1,33±0,24) log₁₀, nach 10 min von 1,10±0,0 bis 2,40±0,42 (mRF 1,63±0,21) log₁₀ und nach 60 min RF von 1,50±0,38 bis 3,00±0,31 (mRF 2,03±0,22) log₁₀ bestimmt werden. Mit der Belastungslösung „clean conditions“ konnten RF von 0 bis 0,40±0,36 (mRF 0,37±0,23) log₁₀ nach 2 min, von 1,10±0,00 bis 1,70±0,48 (mRF 1,33±0,21) log₁₀ nach 5 min, von 0,20±0,41 bis 1,50±0,38 (mRF 0,87±0,26) log₁₀ nach 10 min und von 1,00±0,45 bis ≥5,00 (mRF ≥2,47) log₁₀ nach 60 min erzielt werden. Die Kontrolltiter lagen zwischen 8,20±0,00 und 8,60±0,36 (mVT 8,43±0,16) log₁₀. Aus den Einzelversuchen, welche mit der Belastung „dirty conditions“ durchgeführt wurden, resultierten nach 2 min RF von 0,20±0,50 bis 0,70±0,32 (mRF 0,50±0,25) log₁₀, nach 5 min von 0 bis 2,00±0,37 (mRF 0,83±0,26) log₁₀, nach 10 min von 0,40±0,46 bis 1,5±0,44 (mRF 0,87±0,25) log₁₀ und nach 60 min von 0,90±0,52 bis 1,60±0,41 (mRF 1,17±0,22) log₁₀. Die Titer der Viruskontrolle lagen zwischen 7,70±0,38 und 8,20±0,00 (mVT 8,00±0,15) log₁₀.

- Statistische Analyse

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen von PMV und EV gegenüber 0,125% PVP-Jod konnten nicht festgestellt werden.

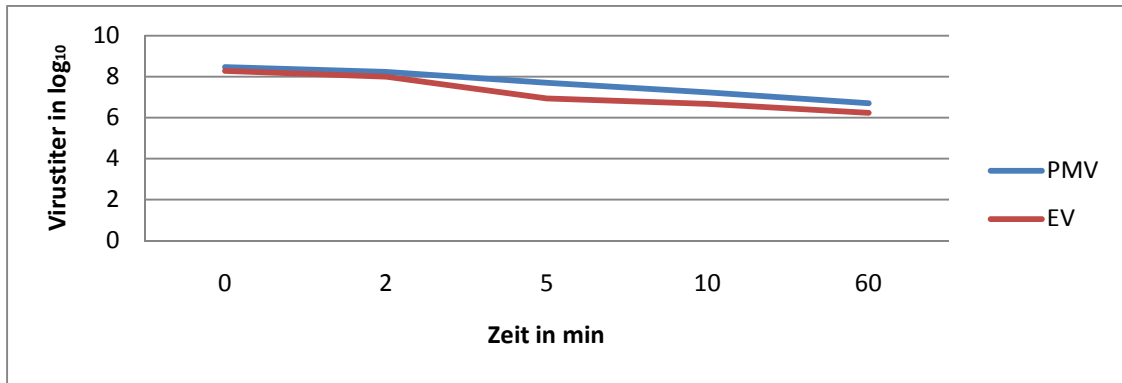


Abb. 44: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,125% Povidon-Jod ohne Eiweißbelastung

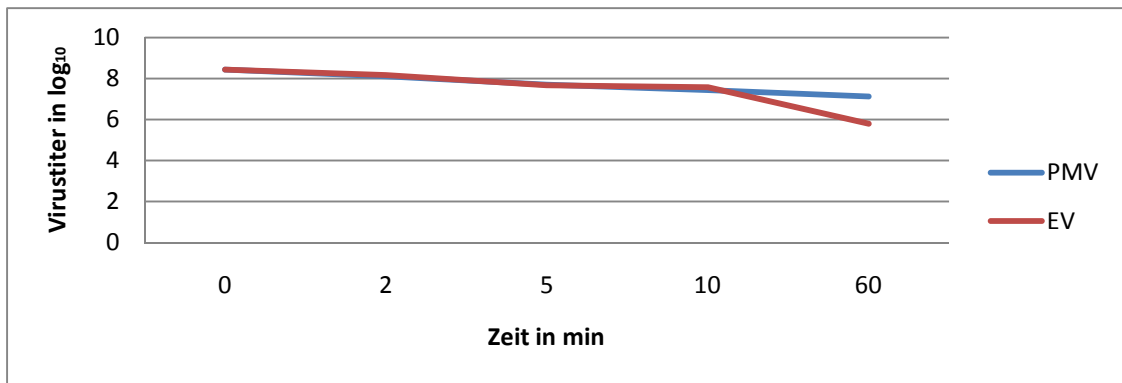


Abb. 45: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,125% Povidon-Jod unter „clean conditions“

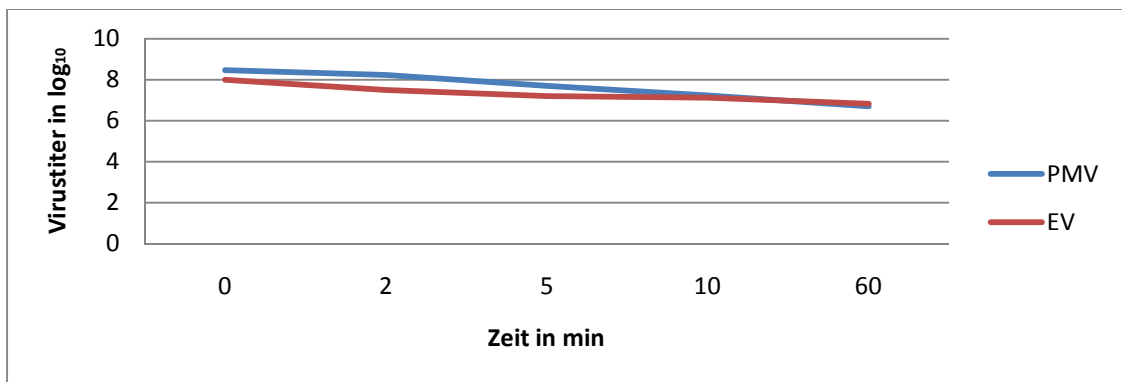


Abb. 46: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,125% Povidon-Jod unter „dirty conditions“

4.5.3 Povidon-Jod 0,5%

Den Verlauf der Virustiter unter Einwirkung von 0,5% PVP-Jod ohne und mit Belastung zeigen die Abb. 47-49.

- Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab

Ohne Eiweißbelastung lagen die Titer der Viruskontrolle zwischen $8,60 \pm 0,36 \log_{10}$ und $9,30 \pm 0,26 \log_{10}$ (mVT $8,87 \pm 0,19 \log_{10}$). Die mRF nach 2 und 5 min Einwirkung waren $0,53 \pm 0,26$ und $0,93 \pm 0,26 \log_{10}$. Reduktionsfaktoren zwischen $2,20 \pm 0,49$ und $3,00 \pm 0,54$ (mRF $2,67 \pm 0,30 \log_{10}$) wurden nach 10 min berechnet, während sich 1 h nach Versuchsbeginn RF von $\geq 4,00$ (mRF $\geq 5,67 \log_{10}$) ergaben. Bei den Versuchen mit der Eiweißbelastung „clean conditions“ wurden Kontrolltiter von $8,20 \pm 0,0$ bis $8,60 \pm 0,36 \log_{10}$ (mVT $8,43 \pm 0,16 \log_{10}$) bestimmt. Mittlere Reduktionsfaktoren von $0,40 \pm 0,27$ und $0,80 \pm 0,24 \log_{10}$ ergaben sich nach 2 und 5 min. Reduktionsfaktoren zwischen $1,90 \pm 0,42$ und $3,00 \pm 0,48$ (mRF $2,43 \pm 0,25 \log_{10}$) wurden nach 10 min ermittelt. Nach 60 min betrug der mRF $\geq 5,23 \log_{10}$. In Anwesenheit der Belastungslösung „dirty conditions“ lagen die Kontrolltiter zwischen $8,50 \pm 0,32$ und $8,70 \pm 0,36$ (mVT $8,60 \pm 0,20 \log_{10}$). Für die Zeiten von 2, 5 und 10 min waren die mRF $0,40 \pm 0,30$, $0,73 \pm 0,29$ und $1,30 \pm 0,28 \log_{10}$. Nach 60 min lagen die RF-Werte zwischen $3,70 \pm 0,48$ und $\geq 5,40$ (mRF $\geq 4,87 \log_{10}$).

- ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk

Aus den Versuchen ohne Eiweißbelastung ergaben sich Kontrolltiter von $7,80 \pm 0,30 \log_{10}$ bis $9,00 \pm 0,32 \log_{10}$ (mVT $8,30 \pm 0,17 \log_{10}$). Nach 2 min Einwirkdauer wurden Titerreduktionen von 0 bis $1,50 \pm 0,45$ (mRF $0,87 \pm 0,27 \log_{10}$) errechnet. Fünf Minuten nach Versuchsbeginn konnten RF von $1,30 \pm 0,44$ bis $4,50 \pm 0,45$ (mRF $2,43 \pm 0,26 \log_{10}$) ermittelt werden. Für die Einwirkzeiten von 10 und 60 min ergaben sich mRF von $\geq 5,10 \log_{10}$. Im Suspensionsversuch unter der Eiweißbelastung „clean conditions“ wurden Kontrolltiter von $8,30 \pm 0,26$ bis $9,60 \pm 0,36$ (mVT $8,80 \pm 0,18 \log_{10}$) bestimmt. Nach 2 min Einwirkung des DM betrugen die RF $0,40 \pm 0,41$ bis $0,90 \pm 0,52$ (mRF $0,60 \pm 0,27 \log_{10}$) und nach 5 min $2,80 \pm 0,58$ bis $4,60 \pm 0,48$ (mRF $3,63 \pm 0,27 \log_{10}$). Mittlere Reduktionsfaktoren von $\geq 5,60 \log_{10}$ waren das Ergebnis aus einer Einwirkdauer von 10 und 60 min. Unter Verwendung der Eiweißbelastung „dirty conditions“ ergaben sich Kontrolltiter von $8,00 \pm 0,32$ bis $9,00 \pm 0,32$ (mVT $8,43 \pm 0,17 \log_{10}$). Reduktionsfaktoren

zwischen $0,20 \pm 0,37$ und $1,40 \pm 0,48$ (mRF $0,53 \pm 0,26$) \log_{10} lagen nach 2 min vor. Nach 5 min wurden RF zwischen $0,60 \pm 0,46$ und $2,50 \pm 0,45$ (mRF $1,20 \pm 0,26$) \log_{10} und nach 10 min Einwirkdauer RF zwischen $1,50 \pm 0,44$ und $3,00 \pm 0,45$ (mRF $2,30 \pm 0,27$) \log_{10} nachgewiesen. Ein mRF von $\geq 5,23 \log_{10}$ war nach 60 min zu verzeichnen.

- Statistische Analyse

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen von PMV und EV gegenüber 0,5% PVP-Jod ergaben sich ohne Belastung nach 10 min sowie unter der Belastungslösung „clean conditions“ nach 5 und 10 min.

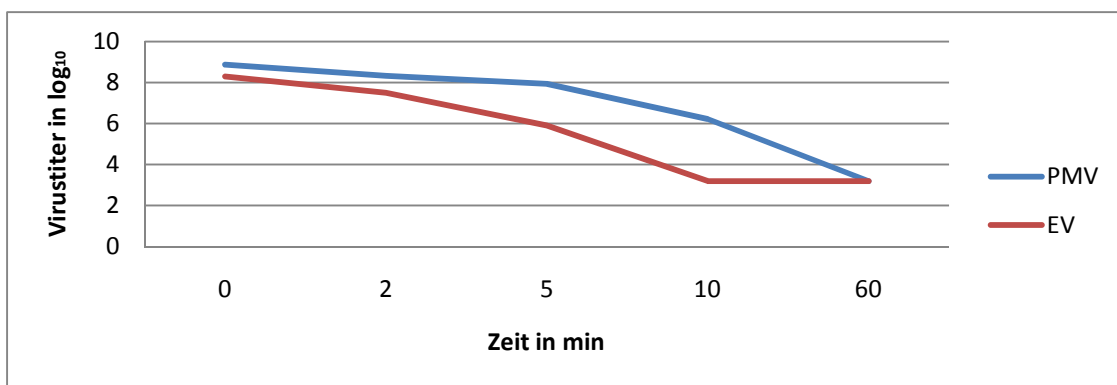


Abb. 47: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,5% Povidon-Jod ohne Eiweißbelastung

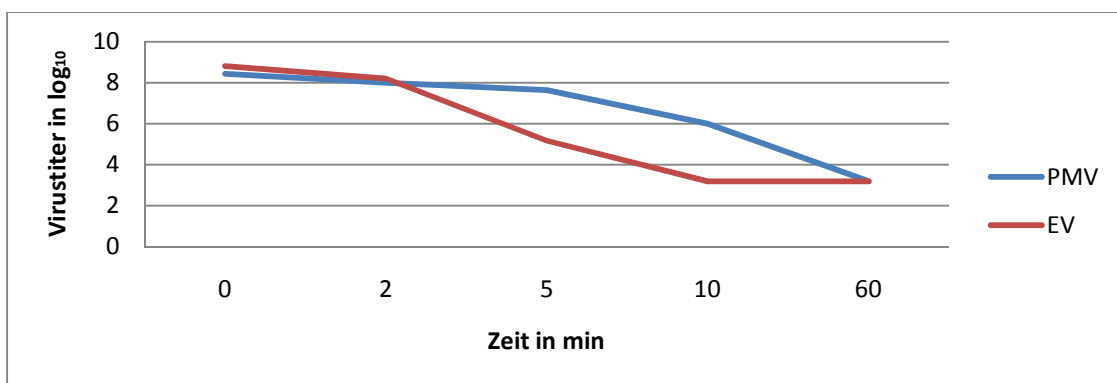


Abb. 48: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,5% Povidon-Jod unter „clean conditions“

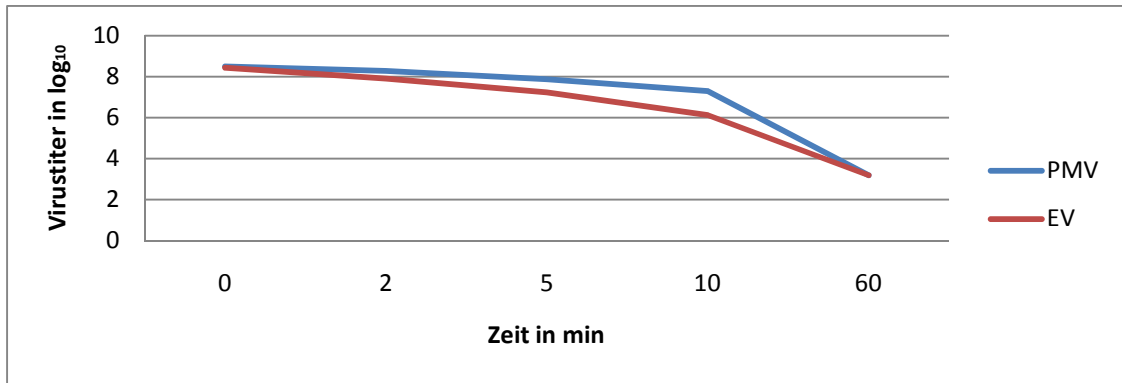


Abb. 49: Verlauf der Virustiter von Poliomyelitisvirus (PMV) und ECHO-Virus (EV) nach Einwirkung von 0,05% Povidon-Jod unter „dirty conditions“

Tab. 10. Zusammenfassende Darstellung der viruziden Wirksamkeit von PVP-Jod gegenüber Poliomyelitis-Virus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk. Daten basieren auf dem arithmetischen Mittel aus 3 unabhängigen Einzelversuchen

Desinfektionsmittel	Konzentration (%)	Einwirkdauer (min)	Viruskontrolle (log ₁₀) und Reduktionsfaktor in log ₁₀ (fett)						Statistische Signifikanz (p-value) n.s. = nicht signifikant		
			Poliovirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab			ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk					
			A. bidest.	Clean conditions	Dirty conditions	A. bidest.	Clean conditions	Dirty conditions	A .bidest.	Clean conditions	Dirty conditions
PVP-Jod	0,05	2	8,47±0,18 0,30±0,24	8,37±0,19 0,06±0,26	8,63±0,20 0,33±0,28	8,30±0,20 1,27±0,30	8,33±0,18 0,20±0,26	8,27±0,18 0,30±0,25	n.s.	n.s.	n.s.
		5	8,47±0,18 1,27±0,26	8,37±0,19 0,23±0,23	8,63±0,20 0,70±0,28	8,30±0,20 1,17±0,29	8,33±0,18 0,23±0,27	8,27±0,18 0,53±0,27	n.s.	n.s.	n.s.
		10	8,47±0,18 1,53±0,24	8,37±0,19 0,57±0,23	8,63±0,20 0,80±0,27	8,30±0,20 1,47±0,28	8,33±0,18 1,03±0,28	8,27±0,18 0,70±0,28	n.s.	n.s.	n.s.
		60	8,47±0,18 2,77±0,27	8,37±0,19 0,97±0,28	8,63±0,20 0,97±0,27	8,30±0,20 2,27±0,27	8,33±0,18 1,07±0,27	8,27±0,18 0,80±0,28	n.s.	n.s.	n.s.
	0,125	20	8,47±0,18 0,40±0,27	8,43±0,15 0,50±0,23	8,47±0,18 0,40±0,27	8,27±0,14 0,27±0,20	8,43±0,16 0,37±0,23	8,00±0,15 0,50±0,25	n.s.	n.s.	n.s.
		5	8,47±0,18 0,77±0,23	8,43±0,15 0,90±0,23	8,47±0,18 0,77±0,23	8,27±0,14 1,33±0,24	8,43±0,16 1,33±0,21	8,00±0,15 0,83±0,26	n.s.	n.s.	n.s.
		10	8,47±0,18 1,23±0,27	8,43±0,15 0,60±0,22	8,47±0,18 1,23±0,27	8,27±0,14 1,63±0,21	8,43±0,16 0,87±0,26	8,00±0,15 0,87±0,25	n.s.	n.s.	n.s.
		60	8,47±0,18 1,77±0,23	8,43±0,15 1,00±0,23	8,47±0,18 1,77±0,23	8,27±0,14 2,03±0,22	8,43±0,16 ≥2,47	8,00±0,15 1,17±0,22	n.s.	n.s.	n.s.
	0,5	2	8,87±0,19 0,53±0,26	8,43±0,16 0,40±0,27	8,60±0,20 0,40±0,30	8,30±0,17 0,87±0,27	8,80±0,18 0,60±0,27	8,43±0,17 0,53±0,26	n.s.	n.s.	n.s.
		5	8,87±0,19 0,93±0,26	8,43±0,16 0,80±0,24	8,60±0,20 0,73±0,29	8,30±0,17 2,43±0,26	8,80±0,18 3,63±0,27	8,43±0,17 1,20±0,26	n.s.	0,006	n.s.
		10	8,87±0,19 2,67±0,30	8,43±0,16 2,43±0,25	8,60±0,20 1,30±0,28	8,30±0,17 ≥5,10	8,80±0,18 ≥5,60	8,43±0,17 2,30±0,27	0,005	0,004	n.s.
		60	8,87±0,19 ≥5,67	8,43±0,16 ≥5,23	8,60±0,20 ≥4,87	8,30±0,17 ≥5,10	8,80±0,18 ≥5,60	8,43±0,17 ≥5,23	n.s.	n.s.	n.s.

Kapitel 5: Diskussion

Die Prävention nosokomial übertragbarer Virusinfektionen konzentriert sich vor allem auf Impfung und hygienische Maßnahmen. Dabei kommt der Verwendung von DM zur Unterbrechung von Infektionsketten eine große Bedeutung zu. Prinzipiell kann die viruzide Wirkung von chemischen DM nicht präzise genug von ihrem Wirkmechanismus abgeleitet werden. Darüber hinaus bestehen Unterschiede bezüglich der Art und Morphologie der zu inaktivierenden Viren. Dies macht die Testung von DM auf Viruzidie unter standardisierten Bedingungen erforderlich, damit in der medizinischen Praxis auch eine effiziente Virusinaktivierung erwartet werden kann. Prinzipiell variiert das Resistenzverhalten von Viren gegenüber chemischen DM stark (Jülich et al. 1993). Behüllte Viren, wie z.B. das Humane Respiratorische Synzytial-Virus, das Influenzavirus oder das HIV haben im Vergleich zu unbehüllten Viren eine weniger ausgeprägte Resistenz bzw. Stabilität gegenüber DM und Antiseptika. Viren ohne Hülle, wie z.B. das EV, das PMV oder das Adenovirus, sind auch im Vergleich zu grampositiven oder gramnegativen Bakterien als resistenter einzuordnen (Rutala 1996).

Behüllung und Lipophilie haben für die Chemoresistenz von Viren eine übergeordnete Bedeutung. Weitere Faktoren, wie Größe des Virus, genetische Eigenschaften, pH-Bedingungen, Fähigkeit, an Oberflächen haften zu bleiben, Temperatur und Anwesenheit anderer Verbindungen kommen hinzu (Jülich et al. 1993). Aufgrund dieser Erkenntnisse erfolgt in Deutschland eine Einteilung von DM mit dem Wirkspektrum „begrenzt viruzid“ mit Wirkung auf behüllte Viren, und mit dem Wirkspektrum „viruzid“, d.h. einem breiten Wirkungsspektrum auch gegen Viren ohne Hülle (DVV und RKI 2005). Da es eine Vielfalt an Viren gibt, die für den Menschen pathogen sind und nicht alle in Zellkulturen angezüchtet werden können, ist es in Deutschland und Europa üblich, Modellviren für die Testung von DM zu verwenden. Dies unterscheidet sich von der Viruzidietestung in den USA. Dort werden einzelne Viren verwendet, die für den Menschen von großer Bedeutung sind, wie z.B. Influenzaviren, Hepatitisviren und Noroviren. Zu den Modellviren, die in Deutschland für die Testung von DM mit breiter viruzider Wirkung verwendet werden, gehören das PMV Typ 1 Impfstamm LSc-2ab, das Adenovirus Typ 5 Stamm Adenoid 75, das Polyomavirus SV 40 Stamm 777 sowie das Vacciniavirus Stamm Elstree (DVV und

RKI 2005, DVV und RKI 2008). Auf europäischer Ebene werden das PMV Typ 1 Impfstamm LSc-2ab sowie das Adenovirus Typ 5 empfohlen (ECS 2006). Eine Prüfung auf begrenzte Viruzidie schließt in Deutschland neben dem bereits genannten Vacciniavirus das Bovine Viral Diarrhea Virus Stamm NADL mit ein. Als einer der zweifelslos resistertesten Vertreter humanpathogener Viren gilt das PMV, welches ursprünglich als Wildvirusversion des Typ 1 Stamm Mahoney fester Bestandteil der Modellviren zur Viruzidietestung in Europa war. Nachdem das Polio-Wildvirus im Jahr 2003 durch den Impfstamm LSc-2ab ersetzt wurde, ist abzusehen, dass das PMV aufgrund der Polioeradikation (WHO/V&B/3.11) voraussichtlich nur noch für wenige Jahre in virologischen Laboratorien zur Verfügung stehen wird. Es besteht deshalb die vordringliche Aufgabe, einen gleichwertigen Ersatz für dieses Virus im Rahmen der Viruzidietestung von DM zu finden. Ein alternatives Testvirus sollte eine ähnliche Resistenz wie das PMV aufweisen. Dieses Virus sollte unbehüllt und hydrophil sein. Außerdem sollte es eine geringe Gefahr für das Personal darstellen und Experimente unter dem BSL-1- oder BSL-2-Level ermöglichen. Weitere Anforderungen sind genetische Stabilität und eine gute Replikation in Zellkulturen. Ein Virus, welches diese Anforderungen erfüllen könnte, ist das EV Typ 1 Stamm Farouk. Dieser Erreger wird auch von der „Viral Task Group of the European Committee for Standardisation“ als möglicher Kandidat für den Ersatz des PMV favorisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Resistenz bzw. die Stabilität des PMV Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und die des EV Typ 1 Stamm Farouk gegenüber DM im quantitativen Suspensionsversuch verglichen. Als Testsubstanzen wurden GA, FA, Ethanol, Isopropanol, PES und PVP-Jod ausgewählt. Auf diese Verbindungen wurde zurückgegriffen, da sie eine Wirksamkeit gegen behüllte und z.T. auch gegen unbehüllte Viren besitzen (RKI 2007). Als viruzider Effekt wurde eine Titerreduktion von $\geq 4 \log_{10}$ definiert (DVV und RKI 2005). Dies bedeutet, dass 99,99% der Testviren inaktiviert wurden. Die Anwesenheit von Eiweiß kann die Wirkung eines DM abschwächen (Good 1979, Werner 1982). Dies wird als „Eiweißfehler“ bezeichnet und kann zum einen durch eine chemische Bindung zwischen DM und Eiweiß bedingt sein. Zum anderen können Eiweiße die Viren umhüllen und auf diese Weise die Desinfektionsmittelwirkung erschweren. Aus diesem Grund wurden alle Versuche ohne und mit Eiweißbelastung durchgeführt. Als Belastungszusätze dienten bovines

Serumalbumin für die Belastung unter „clean conditions“ sowie bovines Serumalbumin plus Hammelerythrozyten für die Belastung unter „dirty conditions“.

Um die Ergebnisse für die vorliegende Arbeit statistisch abzusichern, wurde die Bestimmung der TCID₅₀ in der Zellkultur gewählt. Die Virustiterbestimmung, welche die Menge infektiöser Virusbestandteile angibt, erfolgte mit der Methode nach Spearman (Spearman 1908) und Kärber (Kärber 1931). Diese TCID₅₀ gibt an, bei welcher Virusverdünnung noch 50% der mit den Testviren infizierten Zellkulturen einen cpE aufweisen. Für die statistische Analyse wurden Mittelwert und SD aus acht Einzelergebnissen bestimmt. Die Differenz aus dem Titer der Viruskontrolle und diesem Mittelwert ergab den RF. Die so ermittelten RF wurden anschließend mittels t-Test statistisch miteinander verglichen, um eine unterschiedliche Empfindlichkeit der eingesetzten Viren gegenüber den DM unter gleichen Versuchsbedingungen zu verifizieren. Die gewonnenen Ergebnisse waren nicht nur von der Empfindlichkeit der DM gegenüber den eingesetzten Virusstämmen, sondern zum Teil auch von der Titerhöhe der Viruskontrolle und von der Zytotoxizität des DM abhängig, sodass bei hoher Zytotoxizität ein Titerendpunkt häufig nicht bestimmt werden konnte. Selbst der Einsatz von Neutralisationsmitteln, wie Zysteinhydrochlorid zur Inaktivierung von PES sowie Natriumthiosulfat zur Neutralisation von PVP-Jod, hat auch zytotoxische Effekte zur Folge. Die höchste Toxizität von $10^{-4} \log_{10}$ der Virusverdünnung wurde bei der Verwendung von GA und FA ermittelt. Die DM Ethanol, Isopropanol, PES und PVP-Jod verursachten eine niedrigere Toxizität im Bereich von 10^{-2} bis $10^{-3} \log_{10}$ der Virusverdünnung.

Der Einsatz von Viren mit relativ niedrigen Titern sowie von DM mit hoher Zytotoxizität kann die Ergebnisse der Viruzidietestung beeinflussen (Schoenemann 1987). Wesentliche Voraussetzung für die Erfassung von notwendigen Virustiterreduktionen war deshalb die Verwendung hochtitriger Virussuspensionen. In den hier durchgeführten Untersuchungen lagen die Virusausgangstitern im Bereich von $9,80 \pm 0,36$ bis $11,20 \pm 0,36 \log_{10}$. Dies konnte durch eine Aufkonzentrierung der Virussuspensionen mittels Ultrazentrifugation realisiert werden. Die aufkonzentrierten Virussuspensionen waren vor allem für die Prüfung von GA und FA erforderlich, da diese Verbindungen eine entsprechend hohe Zytotoxizität zeigten. Allerdings besteht

bei der Aufkonzentrierung von Viren durch Ultrazentrifugation der Nachteil der Verklumpung von Viruspartikeln, was zu einer scheinbar erhöhten Stabilität der Viren gegenüber DM führen kann (Jülich et al. 1993). Eine derartige Aggregatbildung kann durch gründliches Vortexen der Virussuspensionen weitgehend aufgehoben werden. Neben der Verwendung aufkonzentrierter Virussuspensionen besteht die Möglichkeit der Separation des DM vor der Titration durch Gelfiltration (Valot et al. 2000). Über diese Methode liegen jedoch bislang in der Literatur nur begrenzte Erfahrungen vor. Sie besitzt auch den Nachteil, dass es bis zum Auftragen der Virusverdünnungsreihe zu einer Zeitverzögerung und einer Nachwirkung des DM kommen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Ausbildung von cpE in der Zellkultur die Infektiosität der Viren bestimmt. Der Einfluss des DM auf Virusbestandteile, wie das Virusgenom, wurde nicht untersucht. Aus vorausgehenden Studien ist aber bekannt, dass mit einer Beeinflussung der Infektiosität keine Inaktivierung des viralen Genoms verbunden sein muss (Sauerbrei et al. 2004a). In weiterführenden Untersuchungen könnte deshalb mittels PCR auch die Inaktivierung des viralen Genoms von PMV und EV untersucht werden. In der Literatur geht man davon aus, dass eine komplette Inaktivierung eines Virus auch die Zerstörung des viralen Genoms beinhaltet (Sauerbrei et al. 2007). Nicht klar definiert ist jedoch die Bedeutung intakter viraler Nukleinsäuren bei Abwesenheit der Virusinfektiosität (Maillard 2004). Bislang geht man davon aus, dass nicht mehr vermehrungsfähige Viren in der Zellkultur auch keine Infektiosität mehr besitzen. Wie in Tab. 11 (Seite 81) zusammengefasst, zeigten die Testviren PMV Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und EV Typ 1 Stamm Farouk eine unterschiedliche Stabilität gegenüber den eingesetzten DM und Antiseptika, worauf im Folgenden getrennt eingegangen werden soll.

Im Versuch mit 0,5%igem GA wurde das PMV ohne Eiweißbelastung sowie mit den Belastungslösungen „clean conditions“ und „dirty conditions“ nach 5 min inaktiviert (siehe Tab. 6, Seite 42). Hinweise auf einen Einfluss der Belastungslösungen auf die Wirksamkeit von GA zeigten sich dabei nicht. Im Vergleich dazu konnte das EV durch 0,5% GA innerhalb einer Einwirkdauer von 60 min nicht signifikant inaktiviert werden. Bei den Versuchen, die mit 2%igem GA gegenüber dem PMV durchgeführt wurden, konnten die Virustiter um $\geq 4 \log_{10}$ ohne und mit Belastungen bereits nach 5 min

reduziert werden. Das EV wurde durch 2%iges GA erst nach 60 min inaktiviert. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen somit die ausgeprägte Stabilität des EV gegenüber GA (Drulak et al. 1978). Demgegenüber verhält sich das PMV gegenüber GA weniger stabil. Statistisch konnten deutliche Differenzen bezüglich der Stabilität von PMV und EV gegenüber GA gesichert werden. Die geringeren RF nach Zugabe der Belastungen „clean“ und „dirty conditions“ bei den Versuchen mit EV bis zum Erreichen eines viruziden Effektes belegen, dass in Anwesenheit von Eiweiß und Blut die viruzide Aktivität von 0,5% GA gegenüber EV verschlechtert werden kann. In der Vergangenheit haben Studien gezeigt, dass die viruzide Aktivität von GA durch Anwesenheit von Blutserum nicht nachteilig beeinflusst wurde (Borick et al. 1964). Im Gegensatz zu 0,5% GA konnte ein Einfluss der Belastungen mit Eiweiß und/oder Erythrozyten aus den Ergebnissen mit 2% GA nicht erkannt werden. Diese Ergebnisse belegen, dass der Einfluss der Belastungslösungen auf die Wirksamkeit von GA von der Konzentration des DM abhängig ist. In vergangenen Untersuchungen konnte das PMV unter Verwendung von 2%igem GA bereits nach 1 min (Tyler et al. 1990) bzw. 10 min (Eterpi et al. 2009) Einwirkdauer inaktiviert werden. Das EV 11 und das PMV Typ 1 wurden innerhalb von 30 min durch 2%iges GA inaktiviert (Narang und Codd 1983).

In vergleichenden Untersuchungen mit 1%igem FA wurde das PMV ohne und mit Eiweißbelastung erst nach 60 min inaktiviert, wobei unter „dirty conditions“ 120 min zum Erreichen einer viruziden Wirkung notwendig waren. Demgegenüber konnte das EV ohne Belastung und mit der Belastung „clean conditions“ bereits nach 30 min inaktiviert werden. Wurde die Belastungslösung „dirty conditions“ verwendet, kam es erst nach 60 min zu einer virusinaktivierenden Wirkung (siehe Tab 6, Seite 42). Berücksichtigt man die Ergebnisse der statistischen Analyse, so erwies sich das PMV gegenüber 1% FA geringfügig stabiler. Bisherige Suspensionsversuche mit 0,7%igem FA ergaben gegen das PMV Wildvirus Typ 1 nach 2 h eine Titerreduktion von zirka $3,50 \log_{10}$ (Munkel 1995, Schorcht et al. 1991) und demzufolge keine signifikante Inaktivierung. Dies entspricht den Ergebnissen, welche auch in dieser Studie im Rahmen der Formaldehydkontrolle erzielt wurden. Bei beiden Viren wurde unter Eiweiß- und Blutbelastung eine längere Einwirkdauer von FA bis zu Inaktivierung benötigt, als dies in den Versuchen ohne Belastungslösung der Fall war. Dies ist deshalb

überraschend, da man bisher davon ausgeht, dass die viruzide Wirkung von FA in Anwesenheit von Blut nicht beeinträchtigt wird (Jülich et al. 1993).

Isopropanol in Konzentrationen von 30% und 70% ohne Belastung sowie mit den Belastungslösungen „clean conditions“ und „dirty conditions“ konnte die Testviren EV und PMV innerhalb von 30 min nicht inaktivieren (siehe Tab. 8, Seite 54). Insofern zeigten beide Viren gegenüber Isopropanol die gleiche Stabilität innerhalb einer Einwirkdauer von 30 min. Die Testung längerer Einwirkzeiten von Isopropanol ist für die Praxis nicht relevant. Durch Ethanol in Konzentrationen von 70% und 80% konnte das PMV innerhalb von 30 min nicht inaktiviert werden. Dagegen zeigte sich das EV sensitiv gegenüber 70%igem Ethanol ohne Belastung und mit der Belastungslösung „clean conditions“ innerhalb von 30 min. Bei den Versuchen mit der Belastungslösung „dirty conditions“ konnte nach 30 min Einwirkung durch das DM keine Inaktivierung des EV erzielt werden (siehe Tab. 7, Seite 48). Unter Verwendung von 80%igem Ethanol wurde das EV ohne sowie mit der Belastungslösung „clean conditions“ nach 10 min inaktiviert. Eine viruzide Wirkung von 80%igem Ethanol mit der Belastungslösung „dirty conditions“ gegenüber dem EV war erst nach 30 min feststellbar. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das PMV gegenüber Ethanol resistenter ist als das EV. Dies bestätigt auch die statistische Analyse der Befunde. Belegt wurde mit den vorliegenden Befunden die reduzierte viruzide Wirkung von Alkoholen in Anwesenheit von Blut und Serum (Wallbank 1985). In der Literatur wurden jedoch auch Studien publiziert, die keinen Einfluss von Belastungslösungen feststellen konnten (Springthorpe et al. 1986). Wie die Ergebnisse mit Ethanol zeigen, ist der Einfluss der Belastungslösungen abhängig von der Konzentration des DM. Bezüglich der Wirkung von Isopropanol zeigten bisherige Versuche eine schwache Wirkung des Alkohols gegenüber Enteroviren (Klein und Deforest 1963). Taylor et al. (1990) berichteten über eine ineffektive Wirkung von 70%igem Isopropanol gegenüber dem PMV. In einer weiteren Studie konnte das PMV Stamm Sabin durch 70% Ethanol innerhalb von 10 min nicht inaktiviert werden (Eterpi et al. 2009), was die vorliegenden Befunde bestätigen.

Die Infektiosität des PMV konnte durch 0.05% PES ohne und mit Eiweißbelastung innerhalb von 30 min nicht signifikant beeinflusst werden (siehe Tab. 9, Seite 60). Im

Vergleich dazu wurde das EV ohne Eiweißbelastung nach 5 min und mit Eiweißbelastung nach 10 min inaktiviert. Durch 0,5% PES wurde die Infektiosität des PMV-Impfstammes LSc-2ab nach 5 min signifikant reduziert, während dies für den EV-Stamm 1 Farouk ohne Eiweißbelastung und mit der Belastung „clean conditions“ bereits nach 2 min sowie unter „dirty conditions“ nach 5 min der Fall war. Somit kann von einer größeren Stabilität des PMV gegenüber PES ausgegangen werden, was auch für nahezu alle Einwirkzeiten statistisch belegt werden konnte. Wie unter 2.5.3 beschrieben, besteht ein Wirkungsverlust der PES vor allem bei Anwesenheit von Blut (Mücke 1973). Die Ursache besteht darin, dass Eisenkationen des Hämoglobins eine Sauerstoffabspaltung von der PES bewirken und diese somit zu Essigsäure reduzieren (Recknagel 1990). In den vorliegenden Versuchen erfolgte die Zugabe von Eiweiß bzw. zusätzlich von Hammelerythrozyten durch die Belastungslösungen „clean conditions“ und „dirty conditions“. Dabei zeigte sich ein Wirkungsverlust nur bei geringeren Konzentrationen und kürzeren Eiwirkzeiten. Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse gehen einher mit den Resultaten bereits publizierter Suspensionsversuche mit 0,2%iger PES und dem PMV Typ 1 als Testvirus. Hier konnte das PMV nach 5 min inaktiviert werden. Hinweise auf einen Einfluss der Belastungslösungen in Form von Human-Serumalbumin oder Jungrindserum bestanden nicht (Munkel 1995).

In den Versuchen mit 0,05%igem PVP-Jod konnten weder das PMV noch das EV innerhalb von 60 min inaktiviert werden. Eine Inaktivierung des PMV und des EV blieb nach 60minütiger Einwirkung von 0,125%igem PVP-Jod ebenfalls aus (siehe Tab. 10, Seite 69). Bei Verwendung von 0,5%igem PVP-Jod wurde das PMV nach 60 min sowohl ohne als auch mit Belastung signifikant inaktiviert. Gegenüber dem EV konnte ohne sowie mit Belastungslösung „clean conditions“ bereits nach 10 min eine signifikante viruzide Wirkung festgestellt werden. Wurden die Versuche mit der Belastung „dirty conditions“ durchgeführt, betrug die Einwirkdauer 60 min bis zum Erreichen eines viruziden Effektes. Damit konnte zumindest für 0,5% PVP-Jod eine signifikant höhere Stabilität des PMV im Vergleich zu EV nachgewiesen werden. Nach Zugabe von Belastungslösungen zeigten sich im Vergleich zu den Versuchen ohne Belastung deutlich geringere RF. Dies spricht dafür, dass für Jod erschwerte Bedingungen in Anwesenheit von Eiweiß oder Blut bestehen, um eine viruzide Wirkung zu erzielen. Prinzipiell ist die viruzide Wirkung von PVP-Jod bei

lipidumhüllten Viren größer als bei Viren ohne Hülle (Prince et al. 1991). In Untersuchungen mit PVP-Jod lag bei Konzentrationen von 0,1% bis 1% PVP-Jod die größte antiseptische Aktivität war (Gottardi 1991, Zamora 1986, Rackur 1985), wobei bei einer Konzentration von 0,5% die höchste Konzentration an freiem molekularem Jod nachweisbar war. Dies ist abhängig von der Reaktion des I_3^- -Ions zu molekularem Jod und Jodid (Schubert 1985). Bei der hier durchgeführten Studie lag die maximale Wirkung von PVP-Jod ebenfalls bei einer Konzentration von 0,5%. Höhere PVP-Jod-Konzentrationen wurden nicht getestet. Proteine können den Anteil von Schwefelwasserstoffgruppen in der Wirksubstanz reduzieren und somit auch den Anteil an freiem Jod vermindern (Gottardi 1991). Eindeutig zu erkennen war dies nur in den Versuchen, welche mit der Belastungslösung „dirty conditions“, dem EV als Testvirus und mit einer PVP-Jod Konzentration von 0,5% vollendet wurden. Ab einer Konzentration von 0,5% konnte die Steigerung der Viruzidie nur durch längere Einwirkdauer, aber nicht durch höhere Konzentrationen erzielt werden (Kawana et al. 1997). Die zytotoxische Wirkung von PVP-Jod kann durch eine Kopplung an Liposomen als Arzneimittelträger deutlich herabgesetzt werden, wobei die viruzide Wirkung des PVP-Jod erhalten bleibt (Wutzler und Sauerbrei 2000). Diese ermöglicht auch ein zielgerechtes Einschleusen des Wirkstoffes in das Wunschgewebe, da Liposome die Plasmamembran der Zellen passieren können.

Der in der vorliegenden Studie eingesetzte quantitative Suspensionsversuch erlaubt die Bestimmung der Chemoresistenz von Viren im Labor unter standardisierten Bedingungen. Der Test wird offiziell empfohlen (DVV und RKI 2005, ECS 2006), berücksichtigt aber bis auf Eiweiß- und Erythrozytenbelastung keine weiteren Faktoren, welche eine Desinfektion unter Praxisbedingungen erschweren können. Eine Aussage über die viruzide Wirkung von DM unter Praxisbedingungen ist deshalb nur mit Vorbehalt möglich, da Viren auf Oberflächen resistenter gegenüber chemischen Noxen sind als in Suspension (Lloyd-Evans et al. 1986). Darüber hinaus erwies sich die Inaktivierung von Viren an der Hand ebenfalls als schwieriger als im Suspensionstest (Schurmann und Eggers 1983). Vorteile des Suspensionsversuchs liegen in der standardisierten Durchführung und statistischen Auswertung der Befunde. Der Suspensionsversuch ermöglicht Aussagen über die Effizienz des getesteten DM und bietet den Vergleich über die Wirksamkeit verschiedener DM (DVV und RKI 2005),

was auch in dieser Arbeit angestrebt wurde. Die Ergebnisse können durch Titrationsbedingungen und Parameter des In-vitro-Tests, welche die Genauigkeit des Tests bestimmen, beeinflusst werden. Dazu gehören z.B. auch die verwendeten Virusstämme und Zellkulturen. Die Empfindlichkeit von Viren gegenüber DM ist auch abhängig von der vorliegenden Viruskonzentration (Kirchhoff 1969, Mahnel 1983). Bei einer geringeren Konzentration an Viruspartikeln verhält sich das Virus sensibler gegenüber DM als beim Einsatz höherer Viruskonzentrationen. Für eine Gesamtbeurteilung der DM könnte der Suspensionsversuch durch einen Carriertest ergänzt werden. Dabei wird das Virus auf einem Träger angetrocknet und fixiert (Jülich et al. 1993, Thraenhart 2001). Erschwerte Bedingungen, wie Antrocknung des Virus auf Flächen oder Händen, eingebettet in Blut, können eine höhere DM-Konzentration oder eine längere Einwirkzeiten erforderlich machen.

Der quantitative Suspensionsversuch ist mit verschiedenen Kontrollversuchen verknüpft, welche die Aussagekraft der Ergebnisse wesentlich erhöhen können. Um nachzuweisen, dass die Zellsuszeptibilität durch die Exposition mit dem DM nicht negativ beeinflusst wird, werden Interferenzkontrollen durchgeführt, die eine Sollwertdifferenz von $\leq 0,5 \log_{10}$ im Vergleich zur Viruskontrolle erreichen müssen (DVV und RKI 2005). Die Toxizitätskontrolle des DM dient zur Unterscheidung von virusbedingten und toxischen Zellveränderungen, welche durch DM verursacht werden können. Hier ergaben sich in der vorliegenden Arbeit in Abhängigkeit vom eingesetzten DM Toxizitäten bis zu einer Verdünnung von $10^{-4} \log_{10}$. Mittels Nachwirkungskontrolle wird ausgeschlossen, dass das DM über die Einwirkungszeit hinaus eine unkontrollierte Nachwirkung auf das zu prüfende Virus besitzt. Auch hier ist der Titerdifferenzsollwert im Vergleich zur Viruskontrolle von $\leq 0,5 \log_{10}$ festgelegt (DVV und RKI 2005). In den Kontrollversuchen mit 0,7%igem FA soll der regelrechte Testablauf sowie eine Empfindlichkeit des Prüfvirus sichergestellt werden.

Die vorliegenden Befunde dieser Arbeit zeigen, dass das PMV Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und das EV Typ 1 Stamm Farouk eine vergleichbare Stabilität gegenüber 30% und 70% Isopropanol in den geprüften Einwirkzeiten besitzen. Ausschließlich in den Versuchen mit GA zeigte das EV eine signifikant höhere Stabilität. Eine signifikant höhere Stabilität des PMV gegenüber dem EV konnte beim Einsatz von 1% FA, 70%

und 80% Ethanol, 0,05% und 0,5% PES sowie 0,5% PVP-Jod nachgewiesen werden. Diese Befunde bedeuten, dass das PMV durch wichtige DM in der klinischen Praxis wesentlich schwieriger zu inaktivieren ist als das EV. Alkoholische Lösungen besitzen beispielsweise eine große Bedeutung bei der hygienischen und chirurgischen Händedesinfektion (Kampf et al. 2007). Peressigsäure gilt als eine der effektivsten Substanzen gegenüber unbehüllten Viren (RKI 2003) und kommt deshalb als Bestandteil in DM zur Produktdesinfektion in der Veterinär- und Humanmedizin zum Einsatz. Die Verwendung von PVP-Jod ist ebenfalls als lokales Antiseptikum weit verbreitet (Reimer et al. 2002). Formaldehyd besitzt nach wie vor eine große Bedeutung für die Desinfektion von Flächen und Räumen (Hilsberg und Andersen 2007, Pkhakadze et al. 1995). Zusammenfassend geht aus der vorliegenden Studie damit hervor, dass das EV Typ 1 Stamm Farouk nicht dafür geeignet scheint, dass PMV Typ 1 Impfstamm LSc-2ab als Modellvirus für die Testung von DM oder Antiseptika auf viruzide Aktivität in der Humanmedizin zu ersetzen.

Prinzipiell ist es nicht überraschend, dass das PMV und EV eine unterschiedliche chemische Stabilität besitzen. Gleiches wurde bislang von differenten Vertretern der Virusfamilie Adenoviridae berichtet (Sauerbrei et al. 2004b). Ursachen für die unterschiedliche Resistenz können Differenzen im Aufbau des Kapsids sowie Besonderheiten im viralen Genom (Sauerbrei et al. 2004a) sein. Insbesondere die Unterschiede der Virusstabilität des PMV und EV gegenüber GA weisen auf eine wesentliche Rolle des Viruskapsids hin. Aus der Literatur sind intratypische Differenzen bezüglich der Sensitivität von EV und PMV gegenüber GA bekannt (Chambon et al. 1997). Dabei zeigte sich, dass eine Interaktion zwischen GA und exponierten Strukturen des Enterovirus-Kapsidproteins VP1, insbesondere von Lysinresten, in einer unterschiedlichen Inaktivierung von Viruspartikeln resultieren kann (Chambon et al. 2004).

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist es notwendig, nach weiteren Viren zu suchen, die das PMV bei der Viruzidietestung von DM ersetzen können. Weitere Viren, welche derzeit zur Diskussion stehen, sind das HAV und verschiedene Parvoviren. Das HAV zeigt zwar eine hohe Widerstandsfähigkeit im Vergleich zum PMV, es lässt sich jedoch nur schlecht in Zellkulturen replizieren. Aus diesem Grunde

müssen die Versuche in Zellkulturen von einer PCR begleitet werden, um die Viruzidie ausreichend beurteilen zu können (Wolff et al. 2001, Bigliardi und Sansebastiano 2006). Animale Parvoviren sind sehr hitzeresistent (Roberts und Hart 2000, Sauerbrei und Wutzler 2009) und zeigen eine ausgeprägte Resistenz gegenüber chemischen DM (Scott 1983). Das bovine Parvovirus Stamm Haden wurde bislang vor allem für die Evaluierung von chemischen und thermischen Desinfektionsmethoden in Hinsicht auf ihre Wirksamkeit getestet (Bräuninger et al. 1994). Animale Parvoviren besitzen den Vorteil, dass sie im Vergleich zum humanen Parovirus B19 in Zellkulturen gut angezüchtet werden können. Nachteilig erweist sich die fehlende klinische Relevanz der Viren für die Humanmedizin. Dennoch erscheint es aus der Sicht der vorliegenden Befunde sinnvoll, das bovine Parvovirus sowie weitere animale Parvoviren, wie porcine und murine Parvoviren (Eterpi et al. 2009), in zukünftige viruzide Vergleichsstudien mit einzubeziehen (Sauerbrei et al. 2009).

Tab. 11: Benötigte Einwirkdauer aller Prüfsubstanzen in Minuten bis zum Erreichen einer Titerreduktion von $\geq 4 \log_{10}$ ohne Belastung mit *A. bidest.* sowie mit den Belastungen „clean conditions“ und „dirty conditions“

Virus Prüfsubstanz	PMV Impfstamm LSc-2ab			EV Stamm 1 Farouk		
	A. bidest.	Clean	Dirty	A. bidest.	Clean	Dirty
GA 0,5%	5	5	5	>60	>60	>60
GA 2%	5	5	5	60	60	60
FA 1%	60	60	120	30	30	60
Iosopropanol 30%	>30	>30	>30	>30	>30	>30
Isopropanol 70%	>30	>30	>30	>30	>30	>30
Ethanol 70%	>30	>30	>30	10	30	>30
Ethanol 80%	>30	>30	>30	10	10	30
PES 0,05%	>30	>30	>30	5	10	10
PES 0,5%	5	5	5	2	2	5
PVP-Jod 0,05%	>60	>60	>60	>60	>60	>60
PVP-Jod 0,125%	>60	>60	>60	>60	>60	>60
PVP-Jod 0,5%	60	60	60	10	10	60

Kapitel 6: Schlussfolgerungen

1. Da sich die viruzide Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln nicht vorhersagen lässt, wird in der Praxis eine Testung auf Viruzidie im quantitativen Suspensionsversuch empfohlen.
2. Für die Testung von Desinfektionsmitteln auf ihre viruzide Wirkung werden in Deutschland Modellviren verwendet.
3. Die Testung auf begrenzte Viruzidie, d.h. eine Wirksamkeit gegenüber behüllten Viren, beinhaltet die Einbeziehung von Vacciniavirus Stamm Elstree und Bovine Viral Diarrhea Virus Stamm NADL.
4. Die Prüfung auf Viruzidie, d.h. eine Wirksamkeit gegen behüllte und unbehüllte Viren, umfasst das Vacciniavirus Stamm Elstree, das Adenovirus Typ 5 Stamm Adenoid 75, das Polyomavirus Stamm 777 sowie das Poliomyelitisvirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab.
5. Das Poliomyelitisvirus gilt als das resistenste humanpathogene Modellvirus gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln.
6. Es ist absehbar, dass im Rahmen der weltweiten Polioeradikation das Poliomyelitisvirus nicht länger als Modellvirus zur Verfügung stehen wird.
7. Andere Viren aus der Familie der Picornaviridae, wie z.B. das ECHO-Virus Typ 1 oder das Hepatitis A-Virus, stehen zur Diskussion, das Poliomyelitisvirus als Testvirus zu ersetzen.
8. Der quantitative Suspensionsversuch ist geeignet, die Chemoresistenz von Poliomyelitisvirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk gegenüber Desinfektionsmitteln und Antiseptika vergleichend zu testen.
9. Der quantitative Suspensionsversuch erlaubt die Bestimmung der Chemoresistenz von Viren unter standardisierten Bedingungen und besitzt Vorteile bezüglich der Durchführbarkeit, Vergleichbarkeit und statistischen Auswertung.
10. Gegenüber 1% FA zeigt sich das Poliomyelitisvirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab geringfügig stabiler als das ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk.

11. Das Poliomyelitisvirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab ist resistenter als das ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk gegenüber 70% und 80% Ethanol, 0,05% und 0,5% Peressigsäure, 0,05%, 0,125% und 0,5% PVP-Jod.
12. Gegenüber 30% und 70% Isopropanol zeigen das Poliomyelitisvirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab und das ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk eine vergleichbare Resistenz innerhalb einer Einwirkzeit von 30 min.
13. Bei Verwendung von 0,5% und 2% Glutaraldehyd zeigt sich das ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk stabiler als das Poliomyelitisvirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab.
14. Fasst man alle Befunde zusammen, so erweist sich das Poliomyelitisvirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab im Vergleich mit dem ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk gegenüber den meist gebräuchlichen Desinfektionsmitteln und Antiseptika als stabiler.
15. Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse kann der Ersatz des Poliomyelitisvirus Typ 1 Impfstamm LSc-2ab durch das ECHO-Virus Typ 1 Stamm Farouk als Modellvirus für die Testung von Desinfektionsmitteln und Antiseptika auf Viruzidie nicht empfohlen werden.
16. Andere Viren, wie das Hepatitis A-Virus oder animale Parvoviren, sollten in zukünftige Vergleichsstudien einbezogen werden.

Kapitel 7: Literaturverzeichnis

- Abzug MJ. 2001. Prognosis for neonates with enterovirus hepatitis and coagulopathy. *Pediatr Infect Dis J*, 20 (8):758-763.
- Apostolov K. 1980. The effects of iodine on the biological activities of myxoviruses. *J Hyg (Lond)*, 84 (3):381-388.
- Baldry M. 1983. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *J Appl Bacteriol*, 3 (54):17-23.
- Baltimore D, Huang AS. 1968. Isopycnic separation of subcellular components from poliovirus-infected and normal HeLa cells. *Science*, 162 (853):572-574.
- Bigliardi L, Sansebastiano G. 2006. Study on inactivation kinetics of hepatitis A virus and enteroviruses with peracetic acid and chlorine. New ICC/PCR method to assess disinfection effectiveness. *J Prev Med Hyg*, 47:56-63.
- Block S. 1991. Peroxygen compounds. Block SS (ed): *Desinfection, Sterilization and Preservation* 4th edn Lea and Febiger, Philadelphia and London:167-181.
- Borick PM, Dondershine FH, Chandler VL. 1964. Alkalinized Glutaraldehyde, a New Antimicrobial Agent. *J Pharm Sci*, 53:1273-1275.
- Bottner A, Daneschnejad S, Handrick W, Schuster V, Liebert UG, Kiess W. 2002. A season of aseptic meningitis in Germany: epidemiologic, clinical and diagnostic aspects. *Pediatr Infect Dis J*, 21 (12):1126-1132.
- Boudouma M, Enjalbert L, Didier J. 1984. A simple method for the evaluation of antiseptic and disinfectant virucidal activity. *J Virol Methods*, 9 (4):271-276.
- Bramer K. 1963. Chemical modification of viral ribonucleic acid. II Bromination and Iodination. *Biochem Biophys Acta*, 72:217-229.
- Bräuninger S, Fischer I, Peters J. 1994. The temperature stability of bovine parvovirus. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, 196:270-278.
- Bronowicki JP, Venard V, Botte C, Monhoven N, Gastin I, Chone L, Hudziak H, Rihn B, Delanoe C, LeFaou A, Bigard MA, Gaucher P. 1997. Patient-to-patient transmission of hepatitis C virus during colonoscopy. *N Engl J Med*, 337 (4):237-240.
- Buxbaum S, Berger A, Preiser W, Rabenau HF, Doerr HW. 2001. Enterovirus infections in Germany: comparative evaluation of different laboratory diagnostic methods. *Infection*, 29 (3):138-142.
- Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA, Vinje J. 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Prot*, 69 (11):2761-2765.
- Cerny E, Kind C, Bachi T. 1983. [Nosocomial epidemic of echovirus type 7 in a neonatology department]. *Helv Paediatr Acta*, 38 (5-6):457-465.
- Chambon M, Archimbaud C, Bailly JL, Gourgand JM, Charbonne F, Peigue-Lafeuille H. 2004. Virucidal efficacy of glutaraldehyde against enteroviruses is related to the location of lysine residues in exposed structures of the VP1 capsid protein. *Appl Environ Microbiol*, 70 (3):1717-1722.
- Chambon M, Jallat-Archimbaud C, Bailly JL, Gourgand JM, Charbonne F, Henquell C, Fuchs F, Peigue-Lafeuille H. 1997. Comparative sensitivities of Sabin and Mahoney poliovirus type 1 prototype strains and two recent isolates to low concentrations of glutaraldehyde. *Appl Environ Microbiol*, 63 (8):3199-3204.
- Chang S. 1971. Modern concept of disinfection. *J sanit Eng Div Proc*:697.

- Deffeminis Rospide HA, Scarabino R, Firpo E, Aguerre ME. 1967. [Pure chronic poliomyelitis]. *Acta Neurol Latinoam*, 13 (1):102-134.
- Dotis J, Roilides E. 2009. H1N1 Influenza A infection. *Hippokratia*, 13 (3):135-138.
- Drulak M, Wallbank AM, Lebttag I. 1978. The relative effectiveness of commonly used disinfectants in inactivation of echovirus 11. *J Hyg (Lond)*, 81 (1):77-87.
- DVV, RKI. 2005. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und Robert Koch Institut zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, 48:1420 - 1426.
- DVV, RKI. 2008. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, (51):937-945.
- ECS. 2006. European Committee for Standardisation. Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine – Test method and requirements (phase 2, step 1); EN 14476:2005/prA1.
- Eterpi M, McDonnell G, Thomas V. 2009. Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J Hosp Infect*, 73 (1):64-70.
- Fields BN, Knipe DM, Howley PM. 2001. Chapter 23 Picornaviridae: The viruses and their replication. Chapter 24 Enteroviruses. In *Fields Virology 4ed* Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia:685-763.
- Good H. 1979. Charakterisierung von Desinfektionsmitteln In: Burri C und Rüter A (Hrsg): *Lokalbehandlung chir Infektionen Aktuelle Probleme der Chirurgie und Orthopädie Bd 12*, Huber, Bern, Stuttgart, Wien:83-86.
- Görtz G, Häring R. 1981. Wirkung und Nebenwirkung von Polyvinylpyrrolidon-Jod (PVP-Jod). *Therapie*, 31:4364-4369.
- Gottardi W. 1991. Iodine and iodine compounds. Block SS (ed): *Disinfection, Sterilization and Perservation* Lea and Fiebig, Philadelphia and London, 4:152-162
- Gromeier M, Solecki D, Patel DD, Wimmer E. 2000. Expression of the human poliovirus receptor/CD155 gene during development of the central nervous system: implications for the pathogenesis of poliomyelitis. *Virology*, 273 (2):248-257.
- Heicken K, Spicher G. 1962. [The mechanism of reversible and irreversible inactivation of microorganisms.]. *Arch Hyg Bakteriol*, 184:105-119.
- Hilsberg P, Andersen LP. 2007. [Sterilisation methods]. *Ugeskr Laeger*, 169 (49):4246-4248.
- Hovi T. 2001. Inactivated poliovirus vaccine and the final stages of poliovirus eradication. *Vaccine*, 19:2268-2272.
- Hsiung G, Melnick J. 1957. Comparative susceptibility of kidney calls from different monkey species to enteric viruses. *J Immunol*, 78:137.
- Hsu Y. 1964. Resistance of infectious RNA and transforming DNA to iodine which inactivates f2 phage and cells. *Nature*, 203:152.
- Jarvis WR. 2007. The Lowbury Lecture. The United States approach to strategies in the battle against healthcare-associated infections, 2006: transitioning from

- benchmarking to zero tolerance and clinician accountability. *J Hosp Infect*, 65 (2):3-9.
- Jilg W. 2000. Schutzimpfungen Kompendium zum aktiven und passiven Impfschutz. 2ed ecomed Verlagsgesellschaft mbH & CoKG; Landsberg/Lech:26-27.
- Jülich W, v Rheinhaben F, Steinmann J, Kramer A. 1993. Zur viruziden Wirksamkeit chemischer und physikalischer Desinfektionsmittel und -verfahren. *Hyg Med*, 18:303-324.
- Kampf G, Steinmann J, H. R. 2007. Suitability of vaccinia virus and bovine viral diarrhea virus (BVDV) for determining activities of three commonly-used alcohol-based rubs against enveloped viruses. *BMC Infect Dis*, 7:5.
- Kandolf R, Hofschneider PH. 1989. Viral heart disease. *Springer Semin Immunopathol*, (11):1-13.
- Kärber G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche *Arch Exper Pathol Pharmacol*, 162:480-483.
- Kawana R, Kitamura T, Nakagomi O, Matsumoto I, Arita M, Yoshihara N, Yanaki K, Yamada A, Morita O, Yoshida Y, Furuya Y, Chiba S. 1997. Inactivation of human viruses by povidone-iodine in comparison with other antiseptics. *Dermatology*, 195:29-35.
- Kiec-Swierczynska M. 1993. [Contact allergy caused by formaldehyde, based on materials from the Institute for medical occupations in Lodz]. *Med Pr*, 44 (3):209-213.
- Kirchhoff H. 1969. [Problems of virus disinfection as exemplified with the Newcastle disease virus]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 76 (3):71-74.
- Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, Larsen GR, Adler CJ, Dorner AJ, Emini EA, Hanecak R, Lee JJ, van der Werf S, Anderson CW, Wimmer E. 1981. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291 (5816):547-553.
- Klein JO, Lerner AM, Finland M. 1960. Acute gastroenteritis associated with ECHO virus, type 11. *Amer J Med Sci*, 240:749.
- Klein M, Deforest A. 1963. The inactivation of viruses by germicides. *Chem Spec Manuf Assoc Proc*, 49:116-118.
- Kline LB, Hull RN. 1960. The virucidal properties of peracetic acid. *Am J Clin Pathol*, 33:30-33.
- Kolmos HJ. 2007. [Hospital infections: sources and routes of infection]. *Ugeskr Laeger*, 169 (48):4138-4142.
- Kruse W. 1970. Halogen action on bacteria, viruses and protozoa. In *Proceedings of the National Special Conference on Disinfection*, (ASCE, Amherst, Mass.):113-137.
- Landsteiner K, Popper E. 1909. Übertragung der Poliomyelitis acuta auf Affen. *Z Immunitätsforschung Orig*, 269 (1):377-390.
- Lange W, Schottler M. 2002. Real-time influenza surveillance in Germany--results of a pilot project. *Med Microbiol Immunol*, 191 (3-4):139-144.
- Larson EL, Morton HE. 1991. Mode of action of alcohols. Block SS (ed): *Disinfection, Sterilisation, and Preservation* Philadelphia, London: Lea & Febiger:191-192.
- Leggat PA, Speare R, Aitken P. 2009. Swine flu and travelers: an Australian perspective. *J Travel Med*, 16 (6):373-376.
- Lloyd-Evans N, Springthorpe VS, Sattar SA. 1986. Chemical disinfection of human rotavirus-contaminated inanimate surfaces. *J Hyg (Lond)*, 97 (1):163-173.

- Mahnel H. 1983. [Disinfection for viruses]. Zentralbl Veterinarmed, 30 (2):81-96.
- Maillard J. 2004. Virucidal activity of biocides. Fraise AP, Lambert PA, Maillard JY, editors Russel, Hugo & Ayliffe's Principles and Practise of Desinfection, Perservation & Sterilisation 4th ed. Oxford: Blackwell:272 - 323.
- Mattison K, Karthikeyan K, Abebe M, Malik N, Sattar SA, Farber JM, Bidawid S. 2007. Survival of calicivirus in foods and on surfaces: experiments with feline calicivirus as a surrogate for norovirus. J Food Prot, 70 (2):500-503.
- Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. 1989. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. Cell, 56 (5):855-865.
- Mentel R, Wegner U, A. Rm, L.: G. 2002. Distribution of Enteroviruses and Analysis of the Association with Clinical Syndroms. The World of Microbes, Abstracts, Paris, 96:229.
- Merka V, Sokol D. 1972. Zum Wirkmechanismus der Peressigsäure, Perameinsäure und Perprionsäure. Z ges Hyg, 1118:638-641.
- Minor P. 2001. Biosafety consequences of eradication of wild-type polioviruses. Lancet, 358:166-167.
- Modrow S, Falke D, Truyen U. 2003. Viren mit einzelsträngigen RNA-Genom in Plusstrangorientierung. Molekulare Virologie, (Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. (Hrsg.); Heidelberg [u.a.] : Spektrum, Akad. Verl.(2):134-160.
- Mücke M. 1973. Zur Bestimmung und zu Spurennachweis von Peressigsäure in Gegenwart von Wasserstoffperoxid für die Praxis der Kaltsterilisation und Desinfektion. Z Med Labortechnik, 14:319-323.
- Munkel K. 1995. Untersuchungen zur viruziden Wirksamkeit der Peressigsäure gegenüber Varizella-Zoster-Virus und dem Poliomyelitis-Wildvirus Typ 1 [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität:44-50.
- Narang HK, Codd AA. 1983. Action of commonly used disinfectants against enteroviruses. J Hosp Infect, 4 (2):209-212.
- Neumann G, Chen H, Gao GF, Shu Y, Kawaoka Y. 2009. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties. Cell Res, 20:51-61.
- Neva FA, Feemster BF, Gorbach LJ. 1954. Clinical and epidemiological features of an unusual epidemic exanthem. J Amer med Ass, 155:544.
- Osztoivits J, Balazs C, Feher J. 2009. [H1N1 influenza - pandemic, 2009.]. Orv Hetil, 150 (50):2265-2273.
- Pkhakadze T, Bogomolova NS, Vinogradova LN. 1995. [New antiseptics and disinfectants in surgery. I]. Khirurgiia (Mosk), (6):34-37.
- Porterfeld JS. 1989. Picornaviridae. In Adrewes' Viruses of Vertebrates London: Bailliere Tindall:120-145.
- Prince H, Prince D, Prince R. 1991. Principles of Viral Control and Transmission. Block SS (ed): Desinfection, Sterilisation, and Perservation Philadelphia, London: Lea & Fiebiger:411-444.
- Protas, II, Nedz'ved MK, Pochebyt BF. 1978. [Clinico-morphologic features of subacute anterior poliomyelitis]. Zh Nevropatol Psikiatr Im S S Korsakova, 78 (7):1039-1043.
- Rackur H. 1985. New aspects of action of povidone iodine. J Hosp Infect, (6):13-23.
- Recknagel S. 1990. Untersuchungen zur kombinierten Reinigung und Desinfektion von Flächen mit Peressigsäure im alkalischen Millieu [Dissertation]. Erfurt: Institut für Medizinische Mikrobiologie, Medizinische Akademie.

- Reimer K, Fleischer W, Brogmann B, Schreier H, Burkhard P, Lanzendorfer A, Gumbel H, Hoekstra H, Behrens-Baumann W. 1997. Povidone-iodine liposomes--an overview. *Dermatology*, 195 (2):93-99.
- Reimer K, Wichelhaus TA, al. SVe. 2002. Antimicrobial effectiveness of povidone-iodine and consequences for new application areas. *Dermatology*, 204(1):114-120.
- Rey M, Girard MP. 2008. The global eradication of poliomyelitis: Progress and problems. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 31 (2-3):317-325.
- RKI. 2003. Liste der vom Robert-Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz, 46:72-95.
- RKI. 2007. Liste der vom Robert-Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren. Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz, 50:1335-1356.
- RKI. 2009. Zum Welt-Poliotag 2009. *Epidemiologisches Bulletin*, (43):435-438.
- Roberts P, Hart H. 2000. Comparison of the inactivation of canine and bovine parvovirus by freeze-drying and dry-heat treatment in two high purity factor VIII concentrates. *Biologicals*, 28:185-188.
- Rosen L, Kern J, Bell JA. 1964. An outbreak of infection with ECHO virus type 3 associated with mild febrile illness *Am J Hyg*, 79:163.
- Rossmann MG, He Y, Kuhn RJ. 2002. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol*, 10 (7):324-331.
- Rueckert RR, Wimmer E. 1984. Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J Virol*, 50 (3):957-959.
- Rutala WA. 1996. APIC guideline for selection and use of disinfectants. 1994, 1995, and 1996 APIC Guidelines Committee. Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. *Am J Infect Control*, 24 (4):313-342.
- Sangar DV, Rowlands DJ, Smale CJ, Brown F. 1973. Reaction of glutaraldehyde with food-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 21 (2):399-406.
- Sauerbrei A, Wutzler P. 2009. Testing thermal resistance of viruses. *Arch Virol*, 154:115-119.
- Sauerbrei A, Eichhorn U, Scheibenzuber M, Wutzler P. 2007. Hexon denaturation of human adenoviruses by different groups of biocides. *J Hosp Infect*, 65 (3):264-270.
- Sauerbrei A, Eschrich W, Brandstadt A, Wutzler P. 2009. Sensitivity of poliovirus type 1 and echovirus type 1 to different groups of chemical biocides. *J Hosp Infect*, 72 (3):277-279.
- Sauerbrei A, Frenzel J, Wutzler P, Sprössig M, Raabe G. 1983. Infektionen durch ECHO-Virus Typ 11 bei Neugeborenen. *Dtsch Gesundheitsw*, 38:501-507.
- Sauerbrei A, Sehr K, Eichhorn U, Reimer K, Wutzler P. 2004a. Inactivation of human adenovirus genome by different groups of disinfectants. *J Hosp Infect*, 57 (1):67-72.
- Sauerbrei A, Schacke M, Gluck B, Egerer R, Wutzler P. 2006. Validation of biocides against duck hepatitis B virus as a surrogate virus for human hepatitis B virus. *J Hosp Infect*, 64 (4):358-365.
- Sauerbrei A, Sehr K, Brandstadt A, Heim A, Reimer K, Wutzler P. 2004b. Sensitivity of human adenoviruses to different groups of chemical biocides. *J Hosp Infect*, 57 (1):59-66.

- Savolainen B, Hovi T, Mulders M. 2001. Molecular epidemiology of echovirus 30 in Europe: succession of dominant sublineages within a single major serotype. *Arch Virol*, (146):21-537.
- Schnuch A, Uter W, Geier J, Frosch PJ, Rustemeyer T. 1998. Contact allergies in healthcare workers. Results from the IVDK. *Acta Derm Venereol*, 78 (5):358-363.
- Schoenemann W. 1987. Überprüfung der Viruzidie von Desinfektionsmitteln. *Hyg Med*, 12:14-17.
- Schorcht S, Nehrkom R, Steinmann J. 1991. Einfluß der Standzeit auf die viruzidie aldehydischer Instrumentendesinfektionsmittel. *Hyg Med*, 16:401-495.
- Schubert R. 1985. Disinfectant properties of new povidone-iodine preparations. *J Hosp Infect*, (6):33-36.
- Schurmann W, Eggers HJ. 1983. Antiviral activity of an alcoholic hand disinfectant. Comparison of the in vitro suspension test with in vivo experiments on hands, and on individual fingertips. *Antiviral Res*, 3 (1):25-41.
- Schwarz W, Schenk H. 1984. Zur Chemie des PVP-Jods. Hierhölzer G und Görtz G (Hrsg): *PVP-Jod in der operativen Medizin* Springer Verlag, Berlin:1-6.
- Scott F. 1983. Virucidal disinfectants and feline viruses. *Am J Vet Res*, 41:410-414.
- Shimizu M, Okuzumi K, Yoneyama A, Kunisada T, Araake M, Ogawa H, Kimura S. 2002. In vitro antiseptic susceptibility of clinical isolates from nosocomial infections. *Dermatology*, 204 (1):21-27.
- Spearman C. 1908. The method of "right and wrong cases" ("constantstimuli") without Gauss's formulae. *Brit J Psychol*, 2:227-242.
- Sporkenbach-Hoffler J, Wieggers KJ, Dernick R. 1983. [Mechanism of virus inactivation by peracids]. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [B]*, 177 (6):469-481.
- Springthorpe VS, Sattar SA. 1990. Chemical disinfection of viruscontaminated surfaces. *Crit Rev Environ Control*, 20:169-229.
- Springthorpe VS, Greiner JL, Lloyd-Evans N, Sattar SA. 1986. Chemical disinfection of human rotaviruses. Efficacy of commercially available products in suspension tests. *J Hyg Camb*, 97:139-161.
- Sprößig M. 1989. Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten der Peressigsäure - 25 Jahre Erfahrung und Entwicklung. *Hyg Med*, (14):498-501.
- Stanway G, Brown F, Christian P, Hovi T, Hypiä T, King A, Knowles N, Lemon S, Minor P, Pallmansch M, Palmenberg A, Skern T. 2005. *Virus Taxonomy*.
- Steigmann AJ, Lipton MM. 1960. Fatal bulbospinal paralytic poliomyelitis due to ECHO 11 virus. *J Amer med Ass*, 174:178.
- Steuer W, Lutz-Dettinger U. 1990. *Leitfaden der Desinfektion, Sterilisation und Entwesung* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 6. Auflage.
- Thraenhart O, Kuwert E. 1975. [Virucidal activity of the disinfectant "gigasept" against different enveloped and non-enveloped RNA-and DNA-viruses, pathogenic for men. I. Investigation in the suspension test (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriell [Orig B]*, 161 (3):209-232.
- Thraenhart O. 1998. Viruswirksame Desinfektion: Die Prophylaxe nosokomialer Virusinfektionen. *Deutsches Ärzteblatt*, (15):35-42.
- Thraenhart O. 2001. Zur Entwicklung von Normen für die Prüfung antiviraler Desinfektionsmittel II. Rabenau HF, Traenhart O und Doerr HE (Hrsg): *Nosokominale Virusinfektion- Erkennung und Bekämpfung* Papst Verlag, Lengerich:25-35.

- Tyler R, Ayliffe GA, Bradley C. 1990. Virucidal activity of disinfectants: studies with the poliovirus. *J Hosp Infect*, 15 (4):339-345.
- Valot S, Edert D, Le Faou A. 2000. A simple method for the in vitro study of the virucidal activity of disinfectants. *J Virol Methods*, 86 (1):21-24.
- Von Magnus H, JH G, Paul J. 1955. A recent definition of poliomyelitis viruses. *Virology*, 1 (2):185-189.
- von Rheinbaben F, Wollf M. 1991. Anmerkung zur Stabilität und chemischen Desinfektion von Viren. *Lab Med*, 15:227-235.
- Wallbank AM. 1985. Disinfectant inactivation of AIDS virus in blood or serum. *Lancet*, 1 (8429):642.
- Werner H. 1982. Jodophore zur Desinfektion? I. Mitteilung: Scheinbar bakterizide Wirkung im Suspensionsversuch *Hyg Med*, 7:205-212.
- WHO/V&B/3.11. www.who.int, www.polioeradication.org.
- Wolff M, Schmitt J, Rahauss M, König A. 2001. Hepatitis A virus: a test method for virucidal activity. *J Hosp Infect*, 48(Supp A):18-22.
- Wolff MH. 1992. Virusbedingte nosokomiale Infektionen. *Hyg Med*, 17:305-312.
- Wouters M, Miller AO, Fenwick ML. 1973. Distortion of poliovirus particles by fixation with formaldehyde. *J Gen Virol*, 18 (2):211-214.
- Wright SA, Bieluch VM. 1993. Selected nosocomial viral infections. *Heart Lung*, 22 (2):183-187.
- Wutzler P, Sauerbrei A. 2000. Virucidal efficacy of a combination of 0.2% peracetic acid and 80% (v/v) ethanol (PAA-ethanol) as a potential hand disinfectant. *J Hosp Infect*, 46 (4):304-308.
- Wutzler P, Kossow KD, Lode H, Ruf BR, Scholz H, Vogel GE. 2004. Antiviral treatment and prophylaxis of influenza in primary care: German recommendations. *J Clin Virol*, 31 (2):84-91.
- Yashpal SM, Sunil M, Sagar MG. 1985. The disinfection of respiratory syncytial virus by isopropanol and a chlorhexidine-detergent handwash. *J Hosp Infect*, 6 (1):89-94.
- Zamora J. 1986. Chemical and microbiologic characteristics and toxicity of povidone-iodine solutions. *Am J Surg*, 151:400-406.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. A. Sauerbrei, Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena und A. Brandstädt, Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Jena, den 11.12.2010

Wolfram Eschrich

Danksagung

Bedanken möchte ich mich

besonders bei Herrn Prof. Dr. med. A. Sauerbrei für die Überlassung des Themas, die fachliche Beratung, das Engagement sowie die Ratschläge während der Themenbearbeitung und Abfassung der Dissertation.

bei Herrn Prof. Dr. med. P. Wutzler, Direktor des Institutes für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena für die Möglichkeit, den experimentellen Teil der Arbeit am Institut für Virologie und Antivirale Therapie durchführen zu können.

bei Frau A. Brandstädt, Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena, für die fachliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten sowie

bei den Mitarbeitern des Institutes für Virologie und Antivirale Therapie, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. M. Schacke und Frau M. Alexi, für technische Zuarbeiten und fachliche Unterstützung.